



Max-Planck-Institut  
für Physiologische und Klinische Forschung  
Bad Nauheim  
W.G.Kerckhoff - Institut



# Diätinduzierte und temperaturabhängige Störungen im Leptinsystem von C57Bl/6J-Mäusen



INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

ALEXANDRA STEINBRÜCK - POULET

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
édition scientifique

ISBN 3-89687-684-8

**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 2004

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.

1<sup>st</sup> Edition 2004

© 2004 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](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. R. Gerstberger  
**und**  
aus dem Max-Planck-Institut  
für physiologische und klinische Forschung  
W.G. Kerckhoff-Institut, Bad Nauheim  
Betreuerin: Prof. Dr. I. Schmidt

# **Diätinduzierte und temperaturabhängige Störungen im Leptinsystem von C57Bl/6J-Mäusen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Alexandra Steinbrück-Poulet**  
Tierärztin aus Koblenz

Gießen 2004



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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Hoffmann

Gutachter:

Prof. Dr. Gerstberger

Prof. Dr. Schmidt

Prof. Dr. Würbel

Tag der Disputation: 24.06.2004



*Für meine Mutter & meine Großmutter*



# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGEN UND FACHAUSDRÜCKE.....	VI
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Adipositas - Ursachen und Bedeutung in der heutigen Zeit.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Umwelteinflüsse.....	2
1.1.2 Genetische Einflüsse.....	3
<b>1.2 Leptin.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Entdeckung und Funktion.....	4
1.2.2 Sekretion und Wirkung am Rezeptor.....	5
1.2.3 Regulation des Plasmaleptinspiegels.....	6
1.2.4 Vermittlung der Leptinwirkung über neuropeptiderge Systeme.....	7
1.2.5 Leptinresistenz.....	7
<b>1.3 Adipositas bei Tiermodellen unter Berücksichtigung der für den Menschen zutreffenden Umweltfaktoren.....</b>	<b>8</b>
1.3.1 Thermoneutrale Bedingungen.....	8
1.3.1.1 Definition der Thermoneutralzone.....	8
1.3.1.2 Problematik bei der Bestimmung der TNZ.....	9
1.3.1.3 Beeinflussung der Responsivität von Leptin-Effektorsystemen durch thermoneutrale Umgebungstemperaturen.....	11
1.3.2 Diätinduzierte Adipositas.....	12
<b>1.4 Ziele der Arbeit.....</b>	<b>15</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Versuchstiere.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Versuchsreihen.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Futtersorten.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4 Leptinbehandlung.....</b>	<b>20</b>
<b>2.5 Versuchsprotokoll.....</b>	<b>20</b>
2.5.1 Bestimmung der Thermoneutralzone (Versuchsreihe I).....	20
2.5.2 Zehntägige Leptinbehandlung unter thermoneutralen Bedingungen bei ad libitum Fütterung (Versuchsreihe II).....	21

2.5.3 Zehntägige Leptinbehandlung unter thermoneutralen Bedingungen bei limitiertem Futterzugang (Versuchsgruppe III).....	21
2.5.4 Auswirkungen der Umgebungstemperatur auf die Futteraufnahme und den Leptineffekt bei verschiedenen Fütterungsbedingungen.....	22
2.5.5 Eintägige Leptinbehandlung bei 22°C während zyklischer Fütterung mit und ohne Zusatzfutter (Versuchsgruppe IV).....	23
2.5.6 Zehntägige Leptinbehandlung von Tieren mit diätinduzierter Adipositas bei 22°C während Zusatzfütterung.....	24
<b>2.6 Datenerhebung.....</b>	<b>25</b>
2.6.1 Bestimmung der Futteraufnahme.....	25
2.6.2 Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs.....	26
2.6.3 Berechnung der metabolischen Rate.....	27
2.6.4 Bestimmung der Körperzusammensetzung.....	27
<b>2.7 Datenauswertung.....</b>	<b>28</b>
2.7.1 Allgemeine Angaben zur statistischen Auswertung.....	28
2.7.2 Spezielle Angaben zur statistischen Auswertung der Versuchsreihen.....	29
2.7.2.1 Versuchsreihe I.....	29
2.7.2.2 Versuchsreihe II und III.....	29
2.7.2.3 Versuchsreihe IV.....	30
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Versuchsreihe I</b>	
<b>Bestimmung der Thermoneutralzone.....</b>	<b>33</b>
3.1.1 Bestimmung der Thermoneutralzone während ad libitum Fütterung.....	33
3.1.1.1 Temperaturbereich 29-35°C (seit 6 Wochen bei $T_a \geq 29^\circ\text{C}$ ).....	33
3.1.1.2 Temperaturbereich 32-36°C (seit 14 Wochen bei $T_a \geq 29^\circ\text{C}$ ).....	36
3.1.1.3 Zeitverlauf der Futteraufnahme und der Körpermasse im oberen kritischen $T_a$ -Bereich.....	40
3.1.2 Bestimmung der Thermoneutralzone während limitiertem Futterzugang.....	41
<b>3.2 Versuchsreihe II &amp; III</b>	
<b>Zehntägige Leptinbehandlung bei ad libitum oder limitierter Fütterung von Standardfutter unter thermoneutralen Bedingungen.....</b>	<b>45</b>
3.2.1 Problematik bei der Festlegung einer geeigneten limitierten Futtermenge.....	45

3.2.2 Leptinwirkung auf die Futterraufnahme und die Körpermasse bei ad libitum Fütterung und limitiertem Futterzugang unter thermoneutralen Bedingungen.....	48
3.2.3 Leptinwirkung auf den Energieverbrauch bei ad libitum Fütterung und limitiertem Futterzugang unter thermoneutralen Bedingungen.....	53
3.2.4 Leptinwirkung auf die Körperzusammensetzung bei ad libitum Fütterung und limitiertem Futterzugang unter thermoneutralen Bedingungen.....	57
3.2.5 Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Leptinwirkung bei ad libitum und limitierter Fütterung von Standardfutter.....	60
3.2.5.1 Temperaturabhängige Modifikation der Leptinwirkung auf die Futterraufnahme.....	60
3.2.5.2 Temperaturabhängige Modifikation der Leptinwirkung auf die Körperfettmasse und den Körperfettgehalt.....	62
3.2.5.3 Temperaturabhängige Modifikation der Leptinwirkung auf die ADMR.....	64
<b>3.3 Versuchsreihe IV</b>	
<b>zyklische Fütterung von sensorisch attraktivem, hochkalorischem Zusatzfutter.....</b>	<b>66</b>
3.3.1 Beeinflussung der Körpermasse bei periodischem Angebot eines sensorisch attraktiven Zusatzfutters.....	66
3.3.2 Beeinflussung der Leptinresponsivität bei periodischem Angebot eines sensorisch attraktiven Zusatzfutters.....	70
3.3.2.1 Fütterungsbedingte Modifikation der Leptinwirkung auf die Futterraufnahme.....	70
3.3.2.2 Fütterungsbedingte Modifikation der Leptinwirkung auf die Körpermasse.....	74
3.3.3 Die Körpermasse als Bezugswert für Leptinwirkung und Gesamtenergieaufnahme im Vorlauf.....	76
3.3.4 Effekte einer zehntägigen Leptinbehandlung auf Körpermasse und Gesamtenergieaufnahme bei leptinresistenten Tieren mit diät-induzierter Adipositas.....	79
3.3.4.1 Leptineffekte auf die Körpermasse und die Gesamtenergieaufnahme.....	80
3.3.4.2 Leptinbedingte Verschiebung der Anteile von ZF1 und ZF2.....	83

<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>86</b>
<b>4.1 Thermoneutralzone von adulten C57Bl/6J-Mäusen während ad libitum und limitierter Fütterung.....</b>	<b>87</b>
4.1.1 Beurteilung der bei ad libitum Fütterung ermittelten TNZ.....	87
4.1.2 Die UKT als untere Grenze der Zone des minimalen thermoregulatorischen Energieaufwandes.....	89
4.1.3 Die OKT als Grenzwert für das Einsetzen von Hitzestress.....	90
4.1.4 Einfluss einer limitierten Fütterung auf die TNZ von C57Bl/6J-Mäusen.....	92
<b>4.2 Methodische Überlegungen zu den in den Versuchsreihen verwendeten experimentellen Ansätzen.....</b>	<b>93</b>
4.2.1 Definition und methodische Ansätze für die Futterlimitierung.....	93
4.2.2 Wahl von Applikationsart und Dosierung bei der Leptinbehandlung.....	95
4.2.3 Beurteilung des Leptineffekts.....	96
4.2.4 Problematik der Versuchsgruppen-spezifischen Unterschiede.....	97
<b>4.3 Auswirkungen einer thermoneutralen Umgebungstemperatur auf Langzeit-Leptineffekte bei ad libitum oder limitierter Fütterung.....</b>	<b>98</b>
4.3.1 Die Körperfettmasse als Maß für die Leptinwirkung.....	98
4.3.2 Bestehen temperaturabhängige Unterschiede in der Leptinwirkung auf die Körperzusammensetzung?.....	98
4.3.3 Effektorsysteme der Leptinwirkung und deren Modifikation bei Thermoneutralität.....	100
4.3.3.1 Veränderung der Futteraufnahme und der Energieabgabe durch Leptinbehandlung bei ad libitum gefütterten Tieren unter thermoneutralen Bedingungen.....	101
4.3.3.2 Das Auftreten torporartiger Zustände bei Nagern und ihre Beeinflussung durch Leptin in Abhängigkeit von $T_a$ und Futtermenge.....	102
<b>4.4 Auswirkungen eines periodischen Zugangs zu sensorisch attraktiver, hochkalorischer Zusatznahrung.....</b>	<b>104</b>
4.4.1 Diätinduzierte Adipositas.....	104
4.4.1.1 Adipositas als Folge eines periodischen Zugangs zu hochkalorischem Futter.....	104
4.4.1.2 Variabilität im Ausprägungsgrad der diätinduzierten Adipositas.....	106

4.4.2 Veränderungen der Leptinresponsivität bei periodischem Wechsel des Nahrungsangebotes unter Berücksichtigung von Körpermasseänderungen.....	108
4.4.2.1 Erstmaliger Zugang zu Zusatzfutter.....	108
4.4.2.2 Wiederholter Zugang zu Zusatzfutter.....	109
4.4.2.3 Mögliche, die Leptinresponsivität beeinflussende Faktoren und deren Angriffspunkte im Leptin-System.....	110
4.4.3 Wechselwirkungen zwischen Körpermasse, Gesamtenergieaufnahme und Leptinresponsivität bei wechselndem Nahrungsangebot.....	111
4.4.4 Diskussion einer leptinbedingten Beeinflussung der Attraktivität verschiedener Futtersorten.....	113
<b>4.5 Fazit.....</b>	<b>114</b>
 <b>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	 <b>116</b>
<b>6 SUMMARY.....</b>	<b>118</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>120</b>
DANKSAGUNG.....	143

## ABKÜRZUNGEN & FACHAUSDRÜCKE

$\alpha$ MSH.....	" $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone", $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon / Melanokortin
<i>ad libitum</i> .....	zur freien Verfügung
ADMR.....	"average daily metabolic rate", Tagesmittel der Stoffwechselrate
AGRP.....	"agouti-related peptide"
AKR/J.....	Inzucht-Mäusestamm
anabol.....	Gewebe-aufbauend
anorektisch.....	appetithemmend
ein-/ zweifaktorielle ANOVA.....	Varianzanalyse mit einem bzw. zwei berücksichtigten Faktor(en)
B <sub>0</sub> .....	Leerprobe im Radioimmunoassay
BALBC.....	Inzucht-Mäusestamm
BMI.....	"body mass index"
C57Bl/6J.....	Inzucht-Mäusestamm
Cafeteria-Diät.....	schmackhafte, fett- und kohlenhydratreiche Nahrungsmittel-Kombination
CART.....	"cocaine and amphetamine regulated transcript"
Clearance.....	Ausscheidung, Eliminierung
Tagesmaxima Tagesminima/ der MR.....	niedrigster bzw. höchster Wert der 3-h-Mittelwerte innerhalb eines Intervalls von 24 h
epigenetisch.....	genetische Disposition und Einwirken von Umwelteinflüssen führen gleichermaßen längerfristig zu phänotypischen Veränderungen
FFDM.....	"fat-free dry-mass", fettfreie Trockenmasse
His <sub>6</sub> -tagged.....	Histidinreste am N-terminalen Ende des rekombinanten Leptins
Hysteresis.....	Fortdauer einer Wirkung nach Beendigung ihrer Ursache
i.c.v. ....	"intracerebroventriculär", in einen Gehirnvtrikel hinein
i.p. ....	"intraperitoneal", in den Bauchraum hinein

<i>in vitro</i> .....	"im Reagenz-Glas", d.h. außerhalb des lebenden Organismus
<i>in vivo</i> .....	"am Lebendigen", in einem lebenden Organismus
<i>JAK</i> .....	"janus kinase", Tyrosin-Kinase der Janus-Familie
katabol.....	Gewebe-abbauend
kD.....	molekulare Masse (Kilo-Dalton)
KM.....	Körpermasse
ko.....	Kontrolltiere, Kontrollbehandlung mit PBS
MC4.....	Melanokortin-4-Rezeptor
MCH.....	"melanin-concentrating hormone", Melanin-konzentrierendes Hormon
MR.....	"metabolic rate", Stoffwechselrate/Sauerstoffverbrauch
mRNA.....	"messenger ribonucleic acid", messenger Ribonukleinsäure
N.....	Anzahl der Tiere in einer Versuchsgruppe
NPY.....	Neuropeptid Y
ob.....	mit Leptin behandelte Tiere/Leptinbehandlung
<i>ob/ob-Maus</i> .....	Maus des C57Bl/6-Stammes, der aufgrund einer homozygoten Mutation die Fähigkeit zur Bildung von endogenem Leptin fehlt
OKT.....	obere kritische Temperatur der Thermoneutralzone
P.....	Irrtumswahrscheinlichkeit
pair-feeding.....	im Rahmen einer Leptinbehandlung durchgeführtes Kontroll-experiment, bei dem die Tiere eine zu den behandelten Tieren identische Menge an Futter erhalten
PBS.....	"phosphate buffered saline", phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
POMC.....	"pro-opiomelanocortin", Proopiomelanokortin
r.....	Korrelationskoeffizient
Ra-Form.....	Splicevariante des Leptinrezeptors mit kurzer intrazellulärer Domäne
Rb-Form.....	Splicevariante des Leptinrezeptors mit langer intrazellulärer Domäne
Re-Form.....	Splicevariante des Leptinrezeptors ohne intrazellulärer Domäne
RIA.....	Radioimmunoassay
s.c. ....	"subcutan", unter die Haut

SEM.....	"standard-error of mean", Standardfehler eines Mittelwertes
STAT.....	"signal transducers and activators of transcription"
T <sub>3</sub> .....	Trijodthyronin
T <sub>4</sub> .....	Thyroxin
T <sub>a</sub> .....	Umgebungstemperatur
T <sub>c</sub> .....	Körperkerntemperatur
TNZ.....	"Thermoneutralzone", Temperaturbereich, in dem die thermische Anpassung allein durch vaso- und pilomotorische Änderungen erfolgt; minimaler thermoregulatorische Energieverbrauch
TO.....	Kontrollansatz zur Messung der Totalaktivität im Radioimmunoassay
UKT.....	untere kritische Temperatur der Thermoneutralzone
Wildtyp.....	ursprünglich vorhandene Form eines Organismus, die weder züchterisch, noch gentechnisch verändert wurde
ZF1.....	sensorisch attraktives, fett- und kohlenhydratreiches Zusatzfutter, äquikalorisch zu ZF2, mit süßem Geschmack aufgrund von Saccharose als Kohlenhydrate
ZF2.....	sensorisch attraktives, fett- und kohlenhydratreiches Zusatzfutter, äquikalorisch zu ZF1, mit neutralem Geschmack aufgrund von Stärke als Kohlenhydrate

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 ADIPOSITAS – URSACHEN UND BEDEUTUNG IN DER HEUTIGEN ZEIT

Als Adipositas bezeichnet man eine pathophysiologisch relevante Erhöhung der Körpermasse aufgrund einer über das Normalmaß hinausgehenden Steigerung des Körperfettanteils. Sie betrifft neben dem Menschen auch zunehmend kleine Haustiere (dabei vor allem Hund und Katze). Beim Menschen erfolgt eine international angewandte Definition der Adipositas bzw. der extremen Adipositas anhand der 85. und 95. Perzentile für den Bodymass-Index (BMI<sup>1</sup>) der Bevölkerung (die Perzentilen berücksichtigen dabei die Abhängigkeit des BMI von Alter und Geschlecht). Heutzutage sind durch Adipositas bedingte Folgeerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, Herz-Kreislaufkrankungen, Schlaganfall, Fettstoffwechselstörungen, Schlafapnoe, Sterilität sowie bestimmte Tumorarten für 3-8% des Gesundheitsetats moderner Industriestaaten verantwortlich (Kopelman 2000). Gleichmaßen stellt die gesteigerte mechanische Belastung des Gesamtorganismus aufgrund der erhöhten Körpermasse einen zusätzlichen gesundheitlichen Risikofaktor für die Inzidenz von Arthrose, Osteoporose, degenerativen Gelenkerkrankungen, Herzmuskelhypertrophie und respiratorischen Problemen dar (Grio und Porpiglia 1994). In den vergangenen Jahren entwickelte sich die Adipositas infolge ihrer wachsenden Prävalenz und ihres zunehmenden Schweregrades zu einer der bedeutendsten Krankheitsursachen in industriell geprägten Ländern (Kuczarski et al. 1994). Bei der Frage nach den Ursachen der Adipositas wird immer noch bei Laien häufig die Meinung vertreten, dass deren Entstehung allein auf einer mangelnden Disziplin der Betroffenen basiert. De facto handelt es sich bei Mensch und Tier um eine komplexe Störung, bei deren Entstehung sowohl genetische als auch umweltbedingte sowie physiologische und psychosoziale Faktoren eine Rolle spielen, wobei sich eine Unterscheidung zwischen Ursache und verstärkenden Faktoren infolge von Sekundärererscheinungen (=Kausalitätsprinzip) als äußerst schwierig erweist. Zum Beispiel wurden im Rahmen von Untersuchungen an Tieren u.a. die Interaktion zwischen Körpermasse und Stellung des Individuums innerhalb der sozialen Rangordnung einer Gruppe (Cohen et al. 1997, Wickings und Dixson 1992) sowie ein Einfluss des Fütterungsregimes des Besitzers (Russell et al. 2000) auf die Entwicklung des

---

<sup>1</sup> BMI=Quotient aus Körpermasse (in kg) und Körpergröße<sup>2</sup> (in m<sup>2</sup>)

Körpergewichtes nachgewiesen. Bei Menschen westlicher Industrieländer sind vor allem Bewegungsmangel sowie sehr energiereiche Nahrung als umweltbedingte Faktoren von besonderer Bedeutung, was zur Folge hat, dass der durchschnittliche BMI in den Industrieländern stetig steigt, in Staaten mit einem geringen Bruttosozialprodukt jedoch stagniert (Kopelman 2000). Da es von allgemeinem Interesse ist, Kosten für das Gesundheitswesen durch Prävention weitgehend gering zu halten (Kopelman 2000), wurden in den vergangenen Jahren sowohl genetisch bedingte Faktoren der Adipositas auf molekularbiologischer Ebene als auch umweltbedingte Faktoren mit dem Ziel ihrer Verminderung bzw. Vermeidung untersucht.

### **1.1.1 Umwelteinflüsse**

Unter Berücksichtigung phylogenetischer Faktoren, die sich zu einer Zeit etablierten, in der das Nahrungsangebot begrenzt und der Aufwand zur Beschaffung von Nahrung groß war, stellt die Deposition von Körperfett infolge einer vorübergehenden positiven Energiebilanz einen sinnvollen Mechanismus dar. Ebenso stellt das Drosseln des Stoffwechsels in Zeiten limitierter Nahrungszufuhr (Himms-Hagen 1985) oder extremer Kältebelastung (Johnson und Speakman 2001) eine bei manchen Tierarten besonders hochentwickelte, erfolgreiche Strategie dar, um die Existenz eines Organismus mit Hilfe seiner Energiereserven über einen möglichst langen Zeitraum zu sichern. Heutzutage haben diese Mechanismen beim Menschen in vielen Gebieten der Welt jedoch weitgehend ihren Nutzen verloren, da es aufgrund der Lebensumstände der westlich geprägten Länder zu einer positiven Energiebilanz kommt, bei der das Verhältnis von Energiebedarf und -aufnahme über einen längeren Zeitraum stark zugunsten der Energieaufnahme verschoben ist (Kopelman 2000). Mögliche Ursachen der Adipositas stellen daher einerseits Bewegungsarmut infolge der Nutzung motorisierter Verkehrsmittel, überwiegend sitzenden Tätigkeiten und einer in den letzten Jahren starken Zunahme des Fernsehkonsums (Prentice und Jebb 1995, Gormaker et al. 1996) und andererseits der übermäßige Konsum von zu kalorienreicher, speziell zu fettreicher Nahrung dar (Kopelman 2000). Ein weiterer Grund für die erhöhte Prävalenz von Adipositas bei Menschen moderner Industriestaaten kann in dem beinahe permanenten Aufenthalt innerhalb der thermoneutralen Temperaturzone aufgrund beheizter bzw. klimatisierter Räume und dem Tragen von Kleidung gesehen werden, da sich dabei der für die Thermoregulation benötigte Energiebedarf auf besonders niedrigem Niveau befindet

(Mount 1973). Es ist jedoch häufig schwierig, die genannten umweltbedingten von genetischen Faktoren zu trennen. Zum Beispiel blieb im Rahmen von Untersuchungen, die eine Zunahme der Inzidenz von Adipositas bei Kindern in Abhängigkeit von dem Auftreten von Adipositas bei keinem, einem oder beiden Elternteilen ermittelten (Grio und Porpiglia 1994), weitgehend ungeklärt, ob es sich dabei um einen genetischen Defekt oder die Übernahme der Lebensgewohnheiten der Eltern handelt.

### 1.1.2 Genetische Einflüsse

Die derzeitig bekannten monogenen Mutationen bei Mäusen, die für die Entstehung von Adipositas verantwortlich sind, betreffen das *agouti yellow*- (Bultman et al. 1992), das *obese*- (Zhang et al. 1994), das *fat*- (Naggert et al. 1995), das *diabetes*- (Tartaglia et al. 1995), das *mahogany*- (Nagle et al. 1999) und das *tubby*-Gen (Noben-Trauth et al. 1996). Diese spielen bei Mensch und Haustier jedoch aufgrund ihrer geringen Prävalenz keine bzw. nur eine untergeordnete Rolle. Allerdings wurden mit der Klonierung des *obese*-Gens (Zhang et al. 1994), welches den liporegulatorischen Botenstoff codiert, der später den Namen Leptin erhielt (griech.: leptos = dünn), tiefgreifende Erkenntnisse über Regulationsmechanismen des Fettstoffwechsels und somit auch des Körpergewichtes gewonnen.

Obwohl beim Menschen monogene Mutationen wie z.B. Defekte im Leptin-Gen (Montague et al. 1997, Strobel et al. 1998) bzw. Leptinrezeptor-Gen (Clément et al. 1998) sehr selten vorkommen, die zur Ausbildung einer extremen Adipositas führen, müssen in Anbetracht des epidemischen Auftretens von Adipositas in den westlich geprägten Ländern multigenetische Ursachen in Verbindung mit Umwelteinflüssen für die Entstehung von Adipositas beim Menschen vermutet werden (Neel et al. 1998). Dabei kann bei genetischer Disposition das Einwirken von Umwelteinflüssen, die die Adipositasentwicklung begünstigen, längerfristig eine phänotypische Veränderung hervorrufen (Esparza et al. 2000).

Diese bei Tieren und Menschen vorkommenden multigenetischen Ursachen sind nicht nur prinzipiell viel schwieriger zu erfassen, sondern ihre Manifestation kann von temporären Stoffwechselkonstellationen abhängen. Ähnlich wie beim Menschen können auch bei Tieren prä- und frühe postnatale Umweltfaktoren mit solchen Mutationen interagieren und zu lebenslangen Konsequenzen führen (Reifsnyder et al. 2000). Die unterschiedliche Neigung zur Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas bei verschiedenen Inzucht-

Mäusestämmen (West et al. 1992), die auf Standardfutter vergleichbare Körpermassen aufwiesen, belegt zudem die Bedeutung von Gen-Umwelt-Interaktionen für die Entstehung des Phänotyps auch bei adulten Tieren. Ferner zeigte sich in Untersuchungen an Inzucht-Mäusestämmen, dass die Makronährstoffpräferenz für Fett mit der Neigung zur Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas positiv korreliert ist und auch der in dieser Arbeit untersuchte C57Bl/6J-Mäusestamm zu den Stämmen mit hoher Fettpräferenz und Neigung zu diätinduzierter Adipositas gehört (Smith et al. 2000).

## **1.2 LEPTIN**

### **1.2.1 Entdeckung und Funktion**

Bereits in den 1950er Jahren postulierte Kennedy in seiner *lipostatischen Theorie* das Vorkommen eines zirkulierenden Faktors, der über den Mechanismus der negativen Rückkopplung im Gehirn die Nahrungsaufnahme reguliert (Kennedy 1953). Nachfolgend durchgeführte Parabioseversuche zwischen genetisch adipösen und phänotypisch schlanken Mäusen führten zu der Hypothese, dass es sich dabei um einen humoralen Sättigungsfaktor handelt, der über die Regulation der Futtermittelaufnahme agiert (Coleman 1973). 1994 gelang Zhang et al. die Klonierung des Leptin-Gens, ein Jahr später erfolgte die Determination des zugehörigen Rezeptors (Tartaglia et al. 1995), der im Gehirn vor allem im ventro- und dorsomedialen Teil des Hypothalamus bei hoher Expressivität im Bereich des *Nucleus arcuatus* lokalisiert ist. Mit Hilfe dieses zur Klasse 1 der Cytokin-Rezeptor-Familie gehörenden Rezeptors ist Leptin in der Lage, sowohl das zentrale Nervensystem über die Größe der Fettspeicher zu informieren als auch Einfluss auf die Energieaufnahme (Futtermittelaufnahme) und -abgabe (Stoffwechselrate) auszuüben. Bei dem Proteohormon Leptin (gr. *leptos* = dünn) handelt es sich um ein 16 kD großes Peptid, dessen Sekretion im Prinzip über eine negative Rückkopplung (Ahima und Flier 2000) reguliert wird, wobei der Plasmaleptinspiegel langfristig sowohl mit der vorhandenen Fettmasse (Maffei et al. 1995) als auch mit dem BMI (Considine et al. 1996) positiv korreliert ist. Zusätzlich unterliegt der Plasmaleptinspiegel aber auch akuten Schwankungen. So zeigt sich z.B. beim Menschen bereits nach 24-stündigem Fasten ohne drastischen Gewichtsverlust ein rascher Abfall des Plasmaleptinspiegels als neuroendokrine Reaktion auf einen Hungerzustand (Wagner et al. 2000, Horowitz et al. 2001).

In zahlreichen Untersuchungen zeigte sich, dass bei peripheren Gaben von rekombinantem murinen Leptin über mindestens 4 Tage sowohl bei Wildtyp-Mäusen, als auch bei dem aufgrund einer genetischen Mutation nicht zur Bildung von endogenem Leptin befähigten *ob/ob*-Mäusestamm eine dosisabhängige Senkung des Körpergewichtes bzw. des Körperfettgehaltes (Harris et al. 1998, Pelleymounter et al. 1995, Halaas et al. 1995, Campfield et al. 1995) eintritt. Bei Temperaturen, die denen normaler Haltungsbedingungen entsprechen, beruht dieser liporegulatorische Einfluss einerseits auf einer reduzierten Futteraufnahme, die anfangs vor allem bei *ob/ob*-Mäusen (Pelleymounter et al. 1995, Halaas et al. 1995, Campfield et al. 1995), später jedoch in Abhängigkeit von der applizierten Leptinmenge auch bei Wildtyp-Mäusen (Döring 2000) eindeutig nachgewiesen wurde. Andererseits kommt es bei 24°C im Rahmen einer Leptinbehandlung von Ratten im Säuglingsalter und von adulten Wildtyp-Mäusen mit limitiertem Futterzugang zur Senkung des Körperfettgehaltes infolge eines erhöhten Energieverbrauches. Dieser basiert auf einer Disinhibierung der torporartigen Reduktion (Hudson und Scott 1979) der sympathisch vermittelten zitterfreien Thermogenese im braunen Fettgewebe während des circadianen Minimums (Stehling et al. 1996, Döring et al. 1998). Bei Wildtyp-Mäusen mit limitiertem Futterzugang führte bei normalen Haltungstemperaturen diese über die Stoffwechselrate vermittelte Leptinwirkung zu einer prozentual ähnlichen Senkung des Körperfettgehaltes wie eine Reduktion der Futteraufnahme bei *ad libitum* Fütterung (Döring 2000).

### **1.2.2 Sekretion und Wirkung am Rezeptor**

Das vor allem in den Adipozyten des weißen Fettgewebes, aber auch in Knochen, Ovar-Follikeln, Milchdrüsen, Plazenta und Magen gebildete Leptin (Hoggard et al. 1998, Aoki et al. 1999, Cioffi et al. 1997, Bado et al. 1998) wird in die Blutbahn sezerniert. Seine Wirkung wird über membranständige Rezeptorproteine in den entsprechenden Zielorganen vermittelt, wobei 6 Splice-Varianten des Leptinrezeptors existieren. Die Rb-Isoform mit langer intrazellulärer Domäne spielt bei der direkten Übermittlung der Leptinwirkung im Gehirn die größte Rolle (Trayhurn et al. 1999), da sie als einzige Rezeptorvariante in der Lage ist, über die Interaktion mit *JAK* (*Janus-Kinase*) und *STAT* (*signal transducers and activators of transcription*) eine intrazelluläre Signalkaskade auszulösen (Baumann et al. 1996). Diese Rb-Form des Rezeptors ist hauptsächlich im Hypothalamus, geringfügig jedoch auch in Pankreas, Darm, Niere und Fettgewebe exprimiert (Emilsson et al. 1997, Morton et al. 1998, Hoggard et al. 1997, Siegrist-Kaiser et al. 1997). Ihr Vorkommen im

Nebennierenmark (Cao et al. 1997) deutet auf eine mögliche direkte Regulation (*feedback*) hinsichtlich der Katecholamin-Sekretion hin, was für die Beziehung zwischen Leptin und sympathischem Nervensystem von Interesse sein könnte, bisher jedoch noch nicht eingehend untersucht wurde (Rayner und Trayhurn 2001). Die Re-Isoform des Leptin-Rezeptors ohne intrazelluläre Domäne agiert als lösliches Bindungsprotein für Leptin im Plasma (Ahima und Flier 2000). Da die ebenfalls plasmamembran-initiierte Ra-Isoform mit kurzer intrazellulärer Domäne vor allem im *Plexus choroideus* exprimiert ist, wird deren Funktion als Transportsystem für Leptin über die Blut-Hirn Schranke diskutiert (Banks et al. 1996, Bjorbaek et al. 1998, Ahima und Flier 2000).

### **1.2.3 Regulation des Plasmaleptinspiegels**

Da die renale Leptin-Clearance kontinuierlich in Abhängigkeit von der Konzentration im Blut erfolgt (Cumin et al. 1996, 1997), wird die Höhe des Plasmaleptinspiegels in erster Linie durch die Leptinproduktion in den bereits erwähnten Geweben reguliert. Interaktionen und Regulationsmechanismen, die der engen Korrelation zwischen Körperfettmasse, Leptin-mRNA im Fettgewebe und dem Plasmaleptinspiegel (Maffei et al. 1995, Frederich et al. 1995, Considine und Caro 1997) zu Grunde liegen, wurden bisher noch nicht ausreichend untersucht (Ahima und Flier 2000). Weiterhin wird die Leptinexpression durch folgende Hormonsysteme beeinflusst: Eine Erhöhung des Plasmainsulinspiegels bewirkt auch eine Erhöhung des Plasmaleptinspiegels (Saladin et al. 1995, Sinha et al. 1996) während ein Absinken des Insulinspiegels während des Fastens eine Senkung des endogenen Plasmaleptinspiegels vermittelt (Boden et al. 1996). Glukokortikoide scheinen *in vitro* und *in vivo* einen stimulierenden Einfluss auf die Leptinexpression und -sekretion zu haben (De Vos 1995, Elimam et al. 1998, Halleux et al. 1998). Desweiteren resultiert aus einem Anstieg der Schilddrüsen-Hormone Tri- und Tetrajodthyronin (Escobarmorreale et al. 1997) sowie unter dem Einfluss von Katecholaminen und pharmakologischer Agonisten des sympathischen Nervensystems (Trayhurn et al. 1995, Mantzoros et al. 1996) eine Senkung des Leptinspiegels. Generell verfügen Frauen über höhere Plasmaleptinspiegel als Männer, was sowohl in der unterschiedlichen Verteilung der Fettdepots innerhalb des Körpers als auch in einem die Leptinproduktion hemmenden Einfluss von Testosteron (Rosenbaum et al. 1996) begründet ist.

### 1.2.4 Vermittlung der Leptinwirkung über neuropeptiderge Systeme

Als Vermittler der hypothalamischen Leptinwirkung fungieren sowohl katabol als auch anabol wirkende Neuropeptide, deren Expression durch Leptin erhöht bzw. vermindert wird. So inhibiert Leptin die Expression von NPY (Neuropeptid Y) sowie AGRP (agouti-related-protein), deren Ausschüttung ansonsten eine Stimulation der Futtermittelaufnahme und eine Verringerung der Stoffwechselrate bewirken. Umgekehrt kommt es unter dem Einfluss von Leptin zu einer Steigerung der mRNA-Konzentration von CART (cocain and amphetamine regulated transcript) sowie POMC (Proopiomelanocortin), aus dem sich u.a.  $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon), ein katabol wirkendes Peptid, abspaltet. CART und POMC wirken hemmend auf die Futtermittelaufnahme und stimulieren die Stoffwechselrate (Seeley und Schwartz 1999, Schwartz et al. 2000). Weiterhin wird bei der Vermittlung der Leptinwirkung auch die Beteiligung anderer Neurotransmitter wie MCH (melanin-concentrating hormone) oder Orexin diskutiert (Elmqvist et al. 1999).

### 1.2.5 Leptinresistenz

Da die Körperfettmasse mit dem Plasmaleptinspiegel positiv korreliert ist, verfügen adipöse Säuger, mit Ausnahme der *ob/ob*-Maus, die kein funktionelles Leptin synthetisieren kann, über einen höheren Plasmaleptinspiegel als normalgewichtige Individuen der gleichen Spezies (Maffei et al. 1995). Unter Berücksichtigung der dosisabhängigen Wirkung bei der Behandlung mit rekombinantem murinen Leptin deutet die ausbleibende Reaktion auf einen erhöhten endogenen Leptinspiegel im Falle einer Adipositas auf eine Resistenzbildung hin (Caro et al. 1995, Considine et al. 1995). Am Entstehen einer Leptinresistenz könnten verschiedene Mechanismen zur Vermittlung der Leptin-Wirkung innerhalb der Wirkungskaskade, wie z.B. der Transport von Leptin über die Blut-Hirn Schranke, Veränderungen auf Rezeptorebene (Rezeptordichte, Affinität des Liganden zum Rezeptor) oder auf Ebene der wirkungsvermittelnden neuropeptidergen Systeme beteiligt sein (Spiegelman und Flier 1996, Ahima und Flier 2000, Flier 1998).

### 1.3 ADIPOSITAS BEI TIERMODELLEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER FÜR DEN MENSCHEN ZUTREFFENDEN UMWELTBEDINGUNGEN

Bei der Betrachtung von umweltbedingter Adipositas an als Tiermodell vielfach verwendeten kleinen Nagern muss berücksichtigt werden, dass die normalerweise verwendete kohlenhydrat- und ballaststoffreiche, weniger energiedichte Nagetierdiät (im folgenden als "Standardfutter" bezeichnet) und eine Umgebungstemperatur von 22°C nicht den Umweltbedingungen entsprechen, durch die die Entstehung von Adipositas beim Menschen begünstigt wird. Aus den für die Genese menschlicher Adipositas förderlichen Faktoren (Kopelman 2000) wurde dem Einfluss des ständigen Aufenthalts im thermoneutralen Bereich sowie dem des permanenten Zugangs zu sensorisch attraktiver, hochkalorischer, fettreicher Nahrung (sog. Cafeteria- oder Supermarkt-Diät, Sclafani und Springer 1974) in der vorliegenden Arbeit ein besonderes Augenmerk gewidmet. Aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, dass für die Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas der sensorischen Attraktivität (=palatability) der Nahrung große Bedeutung zukommt. Dabei steigert eine hohe palatability des Futters das Risiko, dass auch Nagetierstämme, die selbst auf hochkalorisches Futter *per se* nicht mit einer diätinduzierten Adipositas reagieren, einen übermäßig hohen Körperfettgehalt entwickeln können (Levin und Dunn-Meynell 2002).

#### 1.3.1 Thermoneutrale Bedingungen

##### 1.3.1.1 Definition der Thermoneutralzone

Zur Aufrechterhaltung seiner Körperkerntemperatur benötigt ein endothermes Tier thermoregulatorische Mechanismen, die mit einem um so größeren Energieaufwand verbunden sind, je extremer die Umgebungstemperatur ( $T_a$ ) ist. Die Möglichkeit der regulatorischen Anpassung an eine hohe  $T_a$  besteht in einer gesteigerten evaporativen Wärmeabgabe, die an eine niedrige  $T_a$  in der Steigerung der Wärmebildung durch Kältezittern oder, bei den hier untersuchten Kleinsäugetern, auch mit Hilfe von zitterfreier Thermogenese im braunem Fettgewebe. In der sogenannten Thermoneutralzone (TNZ) werden diese Mechanismen nicht oder nur minimal eingesetzt, und die erforderliche, geringfügige thermische Anpassung erfolgt ausschließlich mittels vasomotorischer und pilomotorischer Änderung der Wärmeabgabe. Die TNZ wird von der unteren (UKT) und der oberen (OKT) kritischen

$T_a$  begrenzt (Eckert 1993). Die UKT stellt einen Grenzbereich dar, in dem ein endothermes Lebewesen gerade noch in der Lage ist, seine Körpertemperatur ohne Erhöhung seiner metabolischen Wärmeproduktion aufrecht zu erhalten. Darunter steigt die metabolische Rate linear zur abfallenden  $T_a$  an (Mount 1973, Eckert 1993, Hensel et al. 1973). Mit Erreichen der OKT wird die nötige Wärmeabgabe nicht mehr allein über vasomotorische und pilomotorische Reaktionen erzielt, weshalb zur Vermeidung einer Hyperthermie die evaporative Wärmeabgabe durch Schwitzen, Hecheln oder Befeuchten des Haarkleides mit Speichel gesteigert wird, wobei die letztgenannten Mechanismen eine erhöhte Stoffwechselaktivität erfordern. Folglich wird sowohl bei Über- als auch bei Unterschreiten der TNZ ein Anstieg in der metabolischen Rate (MR) in Ruhe verzeichnet (Withers 1992), während der thermoregulatorisch bedingte Energieverbrauch innerhalb des thermoneutralen Bereiches sein Minimum erreicht, im Folgenden als minimale RMR (= resting metabolic rate = MR in Ruhe, Mercer 2001) bezeichnet (Mc Bride et al. 1983, Christopherson und Young 1986). Verhaltensphysiologisch betrachtet wird die subjektive Temperaturempfindung eines endothermen Lebewesens innerhalb der TNZ als angenehm eingestuft = Wohlfühltemperatur (Cabanac 1972, Åstrand und Rodahl 1986), ein Über- oder Unterschreiten der TNZ dagegen ist –psychophysisch fassbar- mit unangenehmen Empfindungen verbunden (Åstrand und Rodahl 1986). Im Hinblick darauf, dass bei Nagetieren eine Hitzeexposition in einigen Fällen auch eine Regelung der Körperkerntemperatur auf erhöhtem Niveau ohne einen Anstieg der MR auslösen kann (Hart 1971), ist es bei der Bestimmung der TNZ hilfreich, ergänzend Kriterien der Verhaltensphysiologie heranzuziehen (Cabanac 1972). Da sich Stress (einschließlich Hitzestress) bei Individuen u.a. in einer reduzierten Futteraufnahme und somit in einer daraus resultierenden Abnahme der Körpermasse äußert (Mitchell und Carlisle 1992), ist es naheliegend, diese beiden Parameter bei Nagetieren als zusätzliche Kriterien neben der Ermittlung der minimalen RMR bei der Festlegung der TNZ zu verwenden.

### 1.3.1.2 Problematik bei der Bestimmung der TNZ

Grundsätzlich existiert keine einheitliche Methode zur Bestimmung der TNZ von Tieren (Mount 1973), so dass es nicht verwunderlich erscheint, wenn in neueren Untersuchungen, die laut Angaben der Autoren unter thermoneutralen Bedingungen stattfanden, bei Mäusen ein  $T_a$ -Bereich von 30° (Kozak et al. 1995),  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  (Trayhurn und James 1978) und  $33^\circ\text{C}$  (Boss et al. 1997) bis  $35^\circ\text{C}$  (Melnik et al. 1997) angegeben wird. Die meisten Studien zur Ermittlung der TNZ beschränken sich auf die Bestimmung der minimalen RMR

während eines relativ kurzen Zeitraumes möglichst innerhalb der tagesperiodischen Ruhephase (Haim und Zisapel 1999, Dohm et al. 2001). Im Vergleich zur basalen MR (=BMR, Grundumsatz), die beim Menschen im Zusammenhang mit der Ermittlung der TNZ bestimmt wird, ist im Tierexperiment der Ausdruck der minimalen RMR die präzisere Wahl (Mercer 2001). Dies beruht darauf, dass die basale MR beim Menschen als die geringstmögliche MR unter Standardbedingungen definiert wird, zu denen neben der Einstellung einer thermoneutralen  $T_a$  weitere Kriterien gehören wie physische Ruhe und psychische Entspannung (Hensel et al. 1973), ein Zeitpunkt nach 14- bis 18-stündigem Fasten, das heisst, im Stoffwechselzustand der sogenannten postresorptiven Phase, und außerhalb der circadianen Schlafphase (The new Encyclopædia Britannica 1994). Bei kleinen Säugetieren und Vögeln sind die Kriterien für diese Standardbedingungen jedoch nicht ohne Weiteres anzuwenden, so dass eine der Definition beim Menschen folgende Bestimmung der BMR bei diesen Tieren streng genommen nicht möglich ist und der Begriff der BMR bei Tieren äußerst verschieden interpretiert wurde. Schwierigkeiten bei der Bestimmung einer der BMR-Definition bei Menschen weitgehend entsprechenden minimalen RMR ergeben sich bei kleinen Säugetieren und Vögeln z.B. dadurch, dass ihr Stoffwechsel bei mehrstündigem Fasten rasch von der Postresorptionsphase in einen gedrosselten Hungerstoffwechsel übergeht. Ferner müsste zur eindeutigen Ermittlung des Status physischer Ruhe parallel zur Bestimmung der MR eine Messung der motorischen Aktivität durchgeführt werden. Der Versuch, den Zustand physischer Ruhe durch experimentell eingeschränkte Aktivität zu erreichen (Ellis et al. 1995), kann bei Tieren außerdem Stress auslösen, der den Zustand psychischer Entspannung als eine weitere nötige Standard-Bedingung verhindert. Außerdem erfolgt die Bestimmung der minimalen RMR oft ohne Rücksicht auf den circadianen Rhythmus der MR (Marhold und Nagel 1995, Trayhurn und James 1978, Trayhurn 1979). Die Bestimmung der minimalen RMR bei Affen während des Schlafes (Aujard et al. 1998) stellte den Versuch dar, möglichst vielen Kriterien der definierten Standard-Bedingungen für die Bestimmung der BMR Rechnung zu tragen. Da die MR in Schlafphasen jedoch unter die BMR sinkt, ist dieser Ansatz kritisch zu beurteilen.

Abgesehen von diesen methodischen Schwierigkeiten ist die Wahl der RMR als alleiniges Kriterium für die Festlegung der TNZ generell unzureichend. Für die Bestimmung der Energiebilanz bei minimalem thermoregulatorischen Aufwand im Rahmen längerfristiger Untersuchungen muss berücksichtigt werden, dass die ausschließlich innerhalb der

Ruhephase ermittelte TNZ nicht die tagesrhythmischen Schwankungen der MR berücksichtigt, die zu einer Veränderung des Bereiches der minimalen thermoregulatorischen Aktivität im Tagesgang führen kann. Folglich ist es für langfristige Energiebilanzuntersuchungen nötig, den  $T_a$ -Bereich zu ermitteln, nachfolgend als 24-h-TNZ bezeichnet, in dem sich die thermoregulatorische Aktivität bzw. der thermoregulatorische Energieverbrauch der Tiere im Tagesmittel auf minimalem Niveau befindet.

### 1.3.1.3 Beeinflussung der Responsivität von Leptin-Effektorsystemen durch thermoneutrale Umgebungstemperaturen

Wie bereits in 1.2.1 erwähnt, stellen sowohl die Regulation der Futterraufnahme als auch die Modulation des Stoffwechsels Effektorsysteme für die Leptinwirkung unter normalen Haltungsbedingungen dar. Bisher vorliegende Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Hemmung der Futterraufnahme durch Leptin unter thermoneutralen Bedingungen erhalten bleibt (Rafael und Herling 2000). Damit übereinstimmend konnte bei adulten F344 x BN-Ratten bei einer  $T_a$  von 26°C, die von den Autoren als thermoneutral definiert wurde, ein ausgeprägter Leptineffekt auf die Futterraufnahme nachgewiesen werden (Scarpace et al. 1997). Quantitative Vergleiche der Responsivität der Futterraufnahme von mit Leptin behandelten Tieren bei verschiedenen  $T_a$  liegen jedoch noch nicht vor.

Effekte einer Leptinbehandlung auf die MR und den Körperfettgehalt, die während moderater Kältebelastung bei Ratten im Säuglingsalter ermittelt wurden, treten bei Aufzucht unter thermoneutralen Bedingungen nicht auf (Stehling et al. 1997). Ob sich diese Befunde, die an juvenilen Ratten während der ersten zwei Lebenswochen ermittelt wurden, auf adulte Individuen übertragen lassen, ist unbekannt. Allerdings wurden im Rahmen einer Studie an adulten *ob/ob* Mäusen unter thermoneutralen Bedingungen (33°C) laut Angaben der Autoren metabolische Effekte des Leptins nicht ausgeschlossen (Rafael und Herling 2000). Dabei zeigten die *ob/ob* Mäuse während einer Langzeit-Leptinbehandlung mit einer Dosierung, die den Plasmaleptinspiegel auf das Sechsfache im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erhöhte, erwartungsgemäß eine drastische Reduktion des Körperfettgehaltes. Verbunden mit einer Reduktion der Futterraufnahme zeigten parallel untersuchte unbehandelte Tiere, die die gleiche Futtermenge wie die behandelten Tiere erhielten (=pair-fed), nur eine halb so starke Reduktion ihrer Körperfettmasse im Vergleich zu den behandelten Tieren. Ferner wurde anhand der Energiebilanz für die mit Leptin behandelten Tiere während des Behandlungszeitraumes eine MR errechnet, die signifikant über der der *pair-fed*-Tiere lag,

jedoch nicht das Niveau der Kontrolltiere erreichte. Diese Ergebnisse wurden jedoch ausschließlich rechnerisch und ohne Zuhilfenahme indirekter Kalorimetrie ermittelt.

### 1.3.2 Diätinduzierte Adipositas

Bei einer diätinduzierten Adipositas mit funktioneller Leptinresistenz handelt es sich um eine Veränderung der Regulationsmechanismen des Körpergewichtes aufgrund einer temporären Fehlernährung, die unter Umständen zu einer dauerhaften Erhöhung des Wertes führt, auf den sich die Körpermasse bei nachfolgend ausgeglichener Energiebilanz spontan einstellt (Levin 2000). Als mögliche Ursache wird u.a. eine Dysregulation der Leptin-Synthese oder -Sekretion bzw. eine Störung der Signaltransmission diskutiert (Ahima und Flier 2000). Die funktionelle Leptinresistenz zeigt sich u.a. darin, dass eine exogene Zufuhr von Leptin in Bezug auf die Hemmung der Nahrungsaufnahme wirkungslos ist.

Um eine Veränderung der Leptinwirkung aufgrund einer diätinduzierten Adipositas in den häufig als Tiermodellen verwendeten Ratten- und Mäusestämmen beurteilen zu können, müssen zunächst die Veränderungen der Futtermittelaufnahme infolge einer Leptinbehandlung während Fütterung von Standarddiät vergleichend berücksichtigt werden. Im Rahmen eintägiger Leptinbehandlungen, die bei normalgewichtigen Mäusen (BalbC und C57Bl/6J) bei 22-24°C mit ausschließlichem Zugang zu Standardfutter durchgeführt wurden, zeigte eine auf zwei Injektionen verteilte subcutane (s.c.) Behandlung mit insgesamt  $\sim 20 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  bereits eine deutliche Wirkung auf die Futtermittelaufnahme (Döring et al. 1998). Bei Verabreichung der Tagesdosis als einmalige Bolusapplikation erhöhte sich die für einen deutlichen Effekt auf die Futtermittelaufnahme nötige Dosierung auf  $\sim 100 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (Döring 2000). Bei zentraler (intracerebroventriculärer = i.c.v.) Leptinapplikation wurde bei C57Bl/6J-Mäusen bereits bei  $\sim 6 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$  der maximale Effekt auf die Futtermittelaufnahme erzielt (Halaas et al. 1997). Normalgewichtige Ratten zeigen unter vergleichbaren Fütterungsbedingungen eine Reduktion der Futtermittelaufnahme bei einer im Bolus verabreichten intraperitonealen (i.p.) Leptin-Dosis von  $\sim 30 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (Lin et al. 2001) oder einer zentral applizierten Dosis von  $\sim 10 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$  (Wang et al. 1999).

Erhalten C57Bl/6J- und AKR/J-Mäuse ausschließlich fettreiche Nahrung (45% Fett<sup>2</sup>), führt nach 16 Tagen eine i.p. Leptinbehandlung mit einer Dosis von  $\sim 600 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  nur noch

---

<sup>2</sup> Alle Daten bezüglich des Fettgehaltes sind in % des Gesamtenergiegehaltes der Nahrung angegeben.

bei dem AKR/J-Stamm zu einer Reduktion von Futtermittelaufnahme und Körpermasse, bei den C57Bl/6J-Tieren zeigt sich bereits keine Leptin-Wirkung mehr (Van Heek et al. 1997). Nach 56-tägigem Bestehen des oben genannten Diätplans bleibt während wiederholter analoger Leptin-Behandlung bei beiden Stämmen eine Beeinflussung von Futtermittelaufnahme oder Körpermasse aus (Van Heek et al. 1997). Nach 70-tägigem Zugang zu hochkalorischem, fettreichen (45% Fett) Futter zeigen AKR/J-Mäuse auch nach der peripheren Verabreichung von Leptin in pharmakologischer Dosis ( $\sim 1500 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , i.p.) eine deutlich verringerte Leptin-Responsivität im Vergleich zu der normalgewichtigen Kontrollgruppe, die ausschließlich mit Standardfutter ernährt wurde (Halaas 1997). Wird AKR/J-Tieren nach 77-84 Tagen hochkalorischer Fütterung Leptin nicht peripher sondern zentral verabreicht, führt jedoch bereits eine Dosis von  $6 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$  zu einer signifikanten Reduktion von Körpermasse und Futtermittelaufnahme (Van Heek et al. 1997). Da diese Leptindosis der zentral wirksamen Dosis bei ausschließlich mit Standardfutter gefütterten Tieren entspricht, ist folglich innerhalb dieser Untersuchung bei AKR/J-Mäusen nach bis zu 84 Tagen hochkalorischer Fütterung keine zentrale Leptinresistenz erkennbar. In einer weiteren Untersuchung (Lin et al. 2000) erhielt eine Gruppe 3 Wochen alter C57Bl/6J-Mäuse hochkalorisches, fettreiches Futter (60% Fett), die zugehörige Kontrollgruppe eine fettarme Diät. Die beobachtete Entwicklung einer durch die Fütterung bedingten Leptinresistenz lässt sich anhand der Versuchsergebnisse in folgende 3 Phasen unterteilen: 1.) Nach 7 Tagen hochkalorischer Fütterung zeigen die Tiere nach einer Injektion (i.p.) mit  $\sim 120 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  Leptin noch eine deutliche Reduktion der Futtermittelaufnahme und der Körpermasse. 2.) Wird eine analoge Leptinbehandlung nach 56 Tagen hochkalorischer Fütterung durchgeführt, kann bereits keine Leptin-Wirkung mehr festgestellt werden. Erhalten diese Tiere jedoch eine Dosis von  $\sim 6 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$  Leptin als zentraler Bolus, unterscheidet sich ihre Reaktion in der Reduktion von Futtermittelaufnahme und Körpergewichts nicht signifikant von der naiver Tiere. 3.) Nach 140 Tagen hochkalorischer Fütterung wird dies jedoch nur mit einer 20-fach größeren zentralen Leptin-Gabe von  $\sim 120 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$  erreicht.

Im Rahmen der Frage, ob und in wie weit eine fütterungsbedingt verringerte Leptin-Responsivität reversibel ist, untersuchten Widdowson et al. (1997) Wistar-Ratten mit diät-induzierter Adipositas, die nach 56-tägiger Fütterung eines Zusatzfutters mit leicht erhöhtem Fettgehalt (13% Fett, 68% Kohlenhydrate) 7 Tage lang ausschließlich weniger energiedichtes Standardfutter erhielten. Auf zentral applizierte Leptinbehandlungen mit  $\sim 30-600 \text{ pmol} \cdot \text{d}^{-1}$  bei Fütterung von Standardfutter reagierten die adipösen Tieren

innerhalb der folgenden 24 h auf keine der verabreichten Leptindosis während normalgewichtige Tiere, die niemals hochkalorisches Zusatzfutter erhielten, eine dosisabhängige, signifikante Reduktion der Futterraufnahme zeigten (Widdowson et al. 1997). Andererseits fällt auf, dass die adipösen Tiere nach Entzug der hochkalorischen Zusatznahrung weniger Standardfutter aufnehmen als die Kontrolltiere, die ausschließlich mit diesem weniger energiedichten Standardfutter ernährt wurden, so dass eine leichte Reduktion des Körpergewichtes auftritt. Dies wurde von den Autoren als eine beginnende Wiederherstellung der Wirkung des endogenen Leptins interpretiert (Widdowson et al. 1997).

Zur Konkretisierung des Zeitpunktes, ab dem die Leptinresponsivität nach Futterwechsel zwischen weniger energiedichter und energiereicher Fütterung nachlässt bzw. wiederkehrt, wurden Osborne-Mendel-Ratten während erstmaligem Zugang zu hochkalorischer Nahrung am 1., 5. und 14. Tag mit Leptin ( $\sim 30 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , i.p.) behandelt (Lin et al. 2001). Dabei zeigt sich lediglich zum ersten Untersuchungszeitpunkt eine signifikante Leptin-Reaktion. Nach 5 und 14 Tagen blieb bei dieser moderaten Dosis aber bereits eine Leptinwirkung auf die Futterraufnahme völlig aus. Wurde die Fütterung nach 19 Tagen hochkalorischer Fütterung bei fehlender Leptinresponsivität wieder auf fettarme Nahrung umgestellt, zeigte sich eine signifikante Leptin-Reaktion bereits wieder nach 5 Tagen (Lin et al. 2001).

In Anbetracht des Zusammenhanges der Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas und der Entwicklung einer Leptinresistenz aufgrund eines hochkalorischen Nahrungsangebotes lässt sich bei dem für diese Arbeit relevanten C57Bl/6J-Mäusestamm zusammenfassend feststellen, dass eine Reduktion der Leptinresponsivität auf eine peripher (i.p.) applizierte Bolusinjektion in einer Dosis von  $120 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  in den ersten 7 Tagen auf einer hochkalorischen, fettreichen Diät noch nicht erkennbar ist (Lin et al. 2000), während nach 16 Tagen hochkalorischer Fütterung auch bei einer fünffach höheren Dosis kein Leptineffekt mehr festgestellt wurde (Van Heek et al. 1997). Bei zentral durchgeführter Leptinbehandlung werden mit wachsender Dauer der hochkalorischen Fütterung immer höhere Dosen benötigt (Lin et al. 2000). Infolge dessen bietet sich dieser Mäusestamm als Tiermodell für die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Nahrungszusammensetzung und Leptinresistenz an.

Untersuchungen der Reversibilität der Leptinresistenz nach Beenden der hochkalorischen Fütterung bei C57Bl/6J-Mäusen liegen bislang noch nicht vor. Ebenso wurde der mögliche

Einfluss der vorausgehenden Dauer des Zugangs zu energiereicher Diät auf die akute Veränderung der Leptinresponsivität bei der Rückkehr zu einem fettarmen und weniger energiedichten Nahrungsangebot bisher nicht näher untersucht. Desweiteren erfolgte die Untersuchung der Entwicklung einer Leptinresistenz und der Ausprägung einer diät-induzierten Adipositas nur auf der Grundlage eines Diätplans, bei dem während hochkalorischer Fütterung kein optionaler Zugang zu weniger energiedichtem Standardfutter bestand, so dass keine Aussage über die palatability der hochkalorischen Nahrung möglich war. Diese ist jedoch von Interesse, da es Hinweise darauf gibt, dass auch Tiere, die nicht zur Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas neigen, beim Angebot einer sehr attraktiven Diät adipös werden (Levin und Dunn-Meynell 2002).

#### **1.4 ZIELE DER ARBEIT**

Das Hauptziel dieser Untersuchung war, die Wirkung von rekombinantem Leptin unter Umweltbedingungen, wie sie für Menschen westlicher Industriestaaten relevant sind, zu untersuchen. Dabei waren der Zugang zu einem praktisch unbegrenzten Nahrungsangebot, welches auch attraktive hochkalorische Kost beinhaltet, und die Tatsache, dass sich Menschen aufgrund von Kleidung und beheizten Räumen überwiegend im thermoneutralen Bereich aufhalten, von besonderem Interesse. Zur Trennung dieser beiden Einzelfaktoren wurden zwei separate Versuchsansätze herangezogen: Während der hochkalorischen Fütterung wurde die für Versuchsmäuse übliche Haltungstemperatur von 22°C gewählt, während unter thermoneutralen Bedingungen nur Standardfutter angeboten wurde. Für alle Versuche wurde die C57Bl/6J-Maus aufgrund ihrer Neigung zu diätinduzierter Adipositas herangezogen (West et al. 1992). Untersuchungen im thermoneutralen Bereich setzen zunächst die Bestimmung der TNZ bei adulten Tieren dieses Stammes voraus. Aufgrund der uneinheitlichen Vorgehensweise bei der Bestimmung der TNZ in vorhergehenden Untersuchungen wurden hierfür geeignete Kriterien im Rahmen der vorliegenden Studie ausgearbeitet. Auf diese Weise wurde versucht, als 24-h-TNZ einen  $T_a$ -Bereich zu ermitteln, in dem die Tiere im Tagesmittel den geringsten Energieumsatz aufgrund einer minimalen thermoregulatorischen Stoffwechselaktivität aufweisen, im folgenden als minimale ADMR (= average daily MR, Tagesmittel der MR) bezeichnet. Dies sollte die Untersuchung der Energiebilanz in Langzeitstudien bei minimalem thermoregulatorischen Energieaufwand ermöglichen.

Um zu prüfen, ob die in einer vorhergehenden Dissertation (Döring 2000) erhobenen Ergebnisse zur Auswirkung einer 10-tägigen Leptinbehandlung auf Körperzusammensetzung, Körpermasse, Futteraufnahme und metabolische Rate bei adulten Mäusen während *ad libitum* und limitierter Fütterung bei 24°C auch unter thermoneutralen Bedingungen Gültigkeit besitzen, wurden analoge Versuche unter den im Vorfeld ermittelten thermoneutralen Bedingungen (34°C) durchgeführt und mit den Ergebnissen bei 24°C verglichen. Zusätzlich wurden bisher nicht ausgewertete Untersuchungen (H. Döring und I. Schmidt, unveröffentlichte Ergebnisse) bei 9° und 30°C mit in die Datenanalyse einbezogen, um die Leptinwirkung auf die Futteraufnahme bei verschiedenen  $T_a$  während *ad libitum* und limitierter Fütterung vergleichen zu können.

Der Einfluss sensorisch attraktiver, hochkalorischer Zusatznahrung auf die Leptinresponsivität wurde durch eintägige Leptinbehandlungen ermittelt. Durch den Vergleich mehrerer solcher Leptinbehandlungen im Versuchsverlauf sollte der Zusammenhang zwischen der Ausprägung einer funktionellen Leptinresistenz und der Ausbildung einer diätinduzierten Adipositas ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden die Tiere zyklisch mit pelletiertem Standardfutter oder mit pelletiertem Standardfutter plus einem hochkalorischen Zusatzfutter ernährt und wiederholt zu definierten Zeitpunkten nach Futterwechsel mit rekombinantem Leptin behandelt. Im Vordergrund stand dabei zunächst die Frage nach der Dauer bis zum Eintritt einer diätinduzierten Leptinresistenz und inwieweit bzw. in welchem Zeitraum diese reversibel ist. Dabei wurde die Futteraufnahme als Maß für die Leptinresponsivität verwendet und, da es bereits bei 10-tägigen Leptinbehandlungen *ad libitum* gefütterter Tiere zu keiner Beeinflussung des Sauerstoffverbrauches gekommen war, auf dessen gleichzeitige Messung verzichtet.

Ferner ergab sich die weiterführende Frage, ob die diätetische Vorgeschichte Einfluss auf die spätere Entwicklung der Körpermasse und der Leptinresponsivität nimmt. Einen weiteren wichtigen Aspekt dieser Arbeit stellte die Detektion individueller Unterschiede in der Leptinresponsivität und dem diätinduzierten Entstehen von Adipositas bei Einzeltieren des gleichen Inzuchtstammes dar. Um bei Tieren, die bei eintägigen Leptinbehandlungen eine diätinduzierte Leptinresistenz zeigten, die Auswirkung einer längerfristigen Leptinbehandlung auf Futteraufnahme und Entwicklung der Körpermasse zu untersuchen, wurde bei einer Gruppe die Leptinbehandlung auf einen Zeitraum von 10 Tagen ausgedehnt. Um festzustellen, ob Leptin eine unterschiedliche Wirkung auf die Aufnahme süßer oder nicht süßer Nahrung hat, standen diesen Tieren während des gesamten Behandlungszeitraumes

neben Standardfutter zwei verschiedene Zusatzfuttersorten, bei denen der Kohlenhydrat-Anteil einmal aus Saccharose (=ZF 1, süßer Geschmack) und einmal aus Stärke (=ZF 2, neutraler Geschmack) bestand, zur Verfügung.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 VERSUCHSTIERE

In allen Versuchsreihen wurden weibliche C57Bl/6J-Mäuse (*Mus musculus*) der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, BRD) verwendet, die im Alter von 3 Wochen in der Tierkolonie des W.G. Kerckhoff-Instituts, Bad Nauheim, eintrafen, wo sie in Gruppen von je 5 Tieren bis zu Versuchsbeginn im Alter von mindestens 6 Wochen verblieben. Danach wurden die Tiere einzeln entweder in 17x17x15cm großen Stoffwechselkäfigen oder in Makrolonkäfigen der Größe M2 gehalten. In allen Versuchsreihen wurden die Tiere bei einem Lichtzyklus von 12:12h Hell:Dunkel auf handelsüblicher Einstreu (Holzsägespäne, Fibre, Altromin, BRD) bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50% gehalten. Wenn nicht anders angegeben, erhielten sie eine pelletierte Nagetierdiät (Altromin 1320, Altromin, Lage, BRD), im folgenden als Standardfutter bezeichnet, und Wasser *ad libitum*, sowie Zellstoff zum Nestbau. Um Störungen während der Ruhephase der Tiere zu vermeiden, erfolgte die tägliche Versorgung der Tiere während der Versuche etwa eine Stunde vor Beginn der Aktivität in der Dunkelphase. Vor Versuchsbeginn hatten die Tiere mindestens eine Woche lang Zeit, sich an die Einzelhaltung und die jeweiligen klimatischen Verhältnisse zu gewöhnen.

### 2.2 VERSUCHSREIHEN

In Versuchsreihe I wurde bei zwei Versuchsgruppen mit unterschiedlichen Fütterungsbedingungen die TNZ bestimmt. In Versuchsreihe II wurde die Wirkung einer 10-tägigen Leptinbehandlung in zwei Versuchsgruppen bei *ad libitum* Fütterung und einer Umgebungstemperatur von 34°C untersucht. In Versuchsreihe III wurde ebenfalls bei 34°C die Wirkung einer 10-tägigen Leptinbehandlung bei einer Versuchsgruppe untersucht, die täglich nur eine limitierte Menge Standardfutter erhielt. Die in Versuchsreihe II und III ermittelten Ergebnisse wurden abschließend mit bei 24°C ermittelten Resultaten (Döring 2000) verglichen. Ferner erfolgte unter Verwendung von zusätzlichen Daten (Döring 2000, I. Schmidt, unveröffentlichte Daten) die Untersuchung der  $T_a$ -Abhängigkeit von

Futteraufnahme und Leptinwirkung. In Versuchsreihe IV wurden zwei Langzeitversuche durchgeführt, in denen die Tiere wiederholt einer eintägigen Leptinbehandlung unterzogen wurden, während sie im zyklischen Wechsel nur Standardfutter oder Standardfutter plus eine sensorisch attraktive, hochkalorische Zusatzdiät (=Zusatzfutter) *ad libitum* erhielten. Eine der beiden Versuchsgruppen wurde außerdem am Ende des Versuches während der Fütterung von Standardfutter plus Zusatzfutter 10 Tage lang mit Leptin behandelt.

### 2.3 FUTTERSORTEN

Das permanent zur Verfügung stehende Standardfutter enthielt eine resorbierbare Energie von ca. 13 kJ/g (Eiden 2002). Einer Versuchsgruppe in Versuchsreihe IV wurde einmalig zu Versuchsbeginn als Zusatzfutter Zartbitter-Kuvertüre (Wissol, BRD) mit einer resorbierbaren Energie von ca. 23 kJ/g angeboten. Ansonsten wurde für Tiere aus Versuchsreihe IV als Zusatzfutter weiße Kuvertüre (Wissol, BRD, ca. 23 kJ/g, ZF 1) und "Stärkeschokolade" (ca. 23 kJ/g, ZF 2) verwendet. Die Stärkeschokolade wurde hergestellt, indem erhitztes Palmin<sup>®</sup> mit Magermilchpulver (Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell, BRD) und Speisestärke (Mondamin<sup>®</sup>, Bestfoods Markenartikel GmbH, Heilbronn, BRD) im gleichen Mischungsverhältnis Fett:Protein:Kohlenhydrate wie in der weißen Kuvertüre versetzt wurde. Nach dem Erstarren ergab sich eine schokoladenartige Substanz, bei der somit die Saccharose äquikalorisch durch Stärke ersetzt war. Den Energiebilanz-Berechnungen für das verwendete Futter lagen die Werte von 18 kJ/g Protein, 39,3 kJ/g Fett und 17,6 kJ/g Kohlenhydrate zugrunde (Physiologie des Menschen 1972). Neben der Verabreichung von jeweils nur einer der oben genannten Sorten des hochkalorischen Zusatzfutters bei den Langzeitstudien mit wechselndem Nahrungsangebot erfolgte im Rahmen einer 10-tägigen Leptinbehandlung auch eine gleichzeitige Gabe von ZF 1 und ZF 2.

## 2.4 LEPTINBEHANDLUNG

Für die Versuche wurde rekombinantes murines Leptin verwendet, welches entweder von der Firma Aventis Pharma (Frankfurt/Main, BRD) freundlicherweise zur Verfügung gestellt (molare Masse =17,57 kD, da His<sub>6</sub>-tagged), oder von der Firma R&D Systems GmbH (Wiesbaden, BRD) gekauft wurde (molare Masse =16 kD). Eine vorangegangene Studie hatte keinen signifikanten Unterschied in der Wirkung von rekombinantem Leptin der Molmasse von 16 kD und His<sub>6</sub>-tagged Leptin der Molmasse von 17,57 kD ergeben (Schmidt et al. 1997). Das Leptin wurde zur Effektivitätssteigerung der Behandlung (Döring 2000) auf zwei Einzeldosen pro Tag verteilt, die s.c. am Beginn der Ruhephase bzw. der Aktivitätsphase in einer Dosis von 100 pmol·g<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> in den Nacken injiziert wurden, während die Kontrolltiere zur selben Zeit das gleiche Volumen an PBS (phosphate-buffered saline, pH 7,4) erhielten. Bei der Dosisberechnung wurde die am Vortag ermittelte mittlere Körpermasse der jeweiligen Versuchsgruppe zu Grunde gelegt. Kontroll- und Leptinbehandlungsgruppen wurden so eingeteilt, dass sie während des Vorlaufs sowohl hinsichtlich des Körpergewichts als auch der Menge des aufgenommenen Gesamtfutters so weit wie möglich ausgeglichen waren. Das Leptin wurde vor der jeweiligen Injektion so mit PBS verdünnt, dass das tägliche Injektionsvolumen pro Tier 50-100 µl betrug.

## 2.5 VERSUCHSPROTOKOLL

### 2.5.1 Bestimmung der Thermoneutralzone (Versuchsreihe I)

Die Tiere zweier Versuchsgruppen (A, N=10 bzw. 8 und B, N=7) waren einzeln in Stoffwechselkäfigen in einer Klima-Box (Modell SB 500 der Firma Weiss Technik, Lindenstruth, BRD) untergebracht. In Gruppe A wurde der Versuch zweimal durchgeführt, wobei die Tiere beim ersten Mal 15 Wochen, beim zweiten Mal 23 Wochen alt waren. Bei der Untersuchung der 15 Wochen alten Tiere (N=10) musste jedoch die Anzahl der Tiere, deren Stoffwechselrate bestimmt wurde, aufgrund der begrenzten Kapazität zur Messung des Sauerstoffverbrauches auf 7 reduziert werden. Die Bestimmung der Mittelwerte von Futteraufnahme und Körpermasse erfolgte daher ebenfalls anhand dieser 7 Tiere. In die

Darstellung der Verläufe von Futteraufnahme und Körpermasse wurden alle 10 Tiere einbezogen. Die N-Zahl der 23 Wochen alten Tiere betrug 8, wobei analog zum ersten Versuchsdurchgang mit 15 Wochen die Bestimmung der Mittelwerte des Sauerstoffverbrauches, der Futteraufnahme und der Körpermasse bei 7 Tieren erfolgte. Während des Versuchs erhielt Gruppe A Standardfutter *ad libitum*, Gruppe B eine limitierte Futtermenge. Bei diesem limitierten Futterzugang ergibt sich jedoch das Problem, dass aufgrund der mit steigender Umgebungstemperatur sinkenden Energieaufnahme auch die an die Tiere mit limitiertem Futterzugang verabreichte Futtermenge mit Erhöhung der Temperatur fortschreitend gedrosselt werden müsste. Da die Ermittlung der für die jeweilige  $T_a$  geeigneten Menge jedoch ein sehr langwieriges Verfahren darstellt (Döring 2000), erhielt Gruppe B (Alter 15 Wochen, N=7) basierend auf Voruntersuchungen (I. Schmidt, unveröffentlichte Daten) eine limitierte Futtermenge von  $1,6 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$  während aller getesteten Temperaturen. Die limitierte Menge entsprach ca. 80% der von Gruppe A bei *ad libitum* Fütterung und einer Umgebungstemperatur von 31-32°C aufgenommenen Futtermenge. In beiden Gruppen erfolgte die Bestimmung der MR mittels indirekter Kalorimetrie bei Temperaturen zwischen 29 und 36°C. Die Temperatur wurde dabei in 1-2°C-Schritten geändert, wobei ein Temperaturintervall jeweils 2-5 Tage dauerte.

### **2.5.2 Zehntägige Leptinbehandlung unter thermoneutralen Bedingungen bei *ad libitum* Fütterung (Versuchsreihe II)**

Nach einer Eingewöhnungsphase von mindestens zwei Wochen bei 34°C wurden jeweils 5 bzw. 4 Tiere aus Versuchsgruppe C (N=10, Alter bei Behandlungsbeginn 16 Wochen) und D (N=10, Alter bei Behandlungsbeginn 26 Wochen) 10 Tage lang mit Leptin behandelt, während die übrigen Tiere als Kontrolltiere dienten. Die Darstellung von Futteraufnahme und Körpermasse im zeitlichen Verlauf erfolgte bei allen Tieren beider Versuchsgruppen. Die Untersuchungen der Körperzusammensetzung, der Körpermasse sowie der Futteraufnahme anhand von Mittelwerten erfolgten ausschließlich bei den 7 Tieren, deren Sauerstoffverbrauch ermittelt wurde. Die Anzahl der mit Leptin behandelten Tiere betrug bei diesen 7 Tieren in Versuchsgruppe C 3 und in Versuchsgruppe D 4. Der der Injektionsphase vorausgehende Zeitraum von 5 Tagen diente als Referenzwert (=Vorlauf). Am Ende des Behandlungszeitraumes wurden die Tiere zur Bestimmung des Körperfettgehaltes getötet.

### 2.5.3 Zehntägige Leptinbehandlung unter thermoneutralen Bedingungen bei limitiertem Futterzugang (Versuchsreihe III)

In Versuchsreihe III wurde in gleicher Weise und bei gleichen Klimabedingungen wie in Versuchsreihe II die Leptinwirkung bei Versuchsgruppe E (N=10, Alter bei Behandlungsbeginn 16 Wochen) und Versuchsgruppe F (N=10, Alter bei Behandlungsbeginn 17 Wochen) untersucht, die täglich eine während des Eingewöhnungszeitraumes schrittweise bis auf 1,3 g limitierte Futtermenge Standardfutter erhielten.

Innerhalb des ca. 50-tägigen Eingewöhnungszeitraumes folgte nach einer 11-tägigen (Gruppe E) bzw. 18-tägigen (Gruppe F) Periode, in der die Tiere Standardfutter *ad libitum* erhielten, ein Zeitraum von ca. 5 Wochen, in dem beide Versuchsgruppen langsam an die limitierte Fütterung gewöhnt wurden. Durch tägliches Wiegen der Tiere wurde kontrolliert, ob ihre Körpermasse nach anfänglichem Gewichtsverlust konstant blieb und einen kritischen Wert von 17 g nicht unterschritt (Döring 2000). Die während der Leptinbehandlungsperiode gefütterte Menge entsprach bei beiden Gruppen ca. 75% der von den *ad libitum* gefütterten Tieren in Versuchsreihe II aufgenommenen Futtermenge. Am Ende des Eingewöhnungszeitraumes erfolgte analog zu 2.5.2 nach 5-tägigem Vorlauf eine 10-tägige Leptinbehandlung mit abschließender Tötung der Tiere beider Gruppen zur Bestimmung des Körperfettgehaltes.

Bei der vor Versuchsgruppe F untersuchten Versuchsgruppe E stellte sich nach Ende des Behandlungszeitraumes heraus, dass mit der für die Versuchsgruppe ermittelten limitierten Futtermenge von 1,35 g die Kriterien eines limitierten Futterzugangs nicht vollständig erfüllt wurden. Infolgedessen wurde ausschließlich Versuchsgruppe F in die quantitative Auswertung von Versuchsreihe III mit einbezogen, während die Werte der unzureichend futterlimitierten Tiere aus Versuchsgruppe E nur exemplarisch aufgeführt wurden. Bei Versuchsgruppe F erfolgte die Untersuchungen der Körperzusammensetzung, der Körpermasse sowie der Futteraufnahme anhand von Mittelwerten ausschließlich bei den 7 Tieren, deren Sauerstoffverbrauch ermittelt wurde. Die N-Zahl der mit Leptin behandelten Tieren betrug dabei 5.

### 2.5.4 Auswirkung der Umgebungstemperatur auf die Futteraufnahme und den Leptineffekt bei verschiedenen Fütterungsbedingungen

Zur Untersuchung der Leptinwirkung auf die Futteraufnahme während *ad libitum* Fütterung und limitiertem Futterzugang bei einer  $T_a$  von 9, 24, 30 und 34°C wurden die in Versuchsgruppe C, D und F ermittelten Ergebnisse bei 34°C mit Daten aus vorhergehenden Untersuchungen (siehe Tab. 1) bei 9, 24 und 30°C ergänzt. Alle verwendeten Versuchsgruppen wurden 10 Tage lang mit einer auf zwei Einzeldosen verteilten Tagesdosis von  $200 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  Leptin behandelt.

$T_a$ [°C]	Fütterung	N	Quelle
9	ad libitum	9	I. Schmidt, unveröffentlichte Ergebnisse
24	ad libitum	22	Döring 2000
24	limitiert	19	Döring 2000
30	ad libitum	11	Döring 2000
30	limitiert	8	I. Schmidt, unveröffentlichte Ergebnisse
34	ad libitum	18	Versuchsgruppe C,D
34	limitiert	10	Versuchsgruppe F

**Tab 1:** Anzahl (N) der bei Untersuchung des Einflusses der Umgebungstemperatur ( $T_a$ ) auf Futteraufnahme und Leptineffekt verwendeten Tiere.

### 2.5.5 Eintägige Leptinbehandlung bei 22°C während zyklischer Fütterung mit und ohne Zusatzfutter (Versuchsreihe IV)

In Versuchsreihe IV wurden bei Gruppe G (N=10, Anfangsalter 7 Wochen) und Gruppe H (N=12, Anfangsalter 13 Wochen) während einer periodisch wechselnden Verabreichung von ausschließlich Standardfutter (*free feeding*, FF) und Standardfutter plus Zusatzfutter (Zusatzfutter, ZF) Langzeitversuche bei 22°C durchgeführt, in denen die Reaktion auf Leptin im Abstand von mindestens 4 Tagen wiederholt getestet wurde, wobei eine Behandlungsgruppe in aufeinanderfolgenden Injektionen jeweils alternierend mit PBS oder Leptin behandelt wurde. Grundsätzlich hatten die Tiere uneingeschränkten Futterzugang mit der Ausnahme, dass Versuchsgruppe G in den beiden ersten Perioden mit ausschließlich Standardfutter nur eine limitierte Futtermenge (*food restricted*, FR) angeboten wurde. Die in diesem Zeitraum ermittelten Daten wurden jedoch nur exemplarisch angegeben und von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die Perioden mit gleicher Fütterungsart dauerten durchschnittlich 15 Tage, wobei die einzelnen Zeiträume zwischen 6 und 23 Tagen variierten.

ten. Um einen eventuellen Einfluss der stark variierenden Körpermassen auf die Leptinbehandlung zu vermeiden, wurden die beiden Behandlungsgruppen so eingeteilt, dass der Mittelwert ihrer Körpermassen nur um maximal 0,5 g variierte.

Diät	Zeit [d]	n Versuchs- gruppen	N	
			Lep	Ko
<b>vor</b>		4	28	28
<b>ZF (erstmalig)</b>	3	5	23	23
	7	6	30	27
	11	3	16	14
	15	4	20	17
<b>nach</b>	3	3	17	13
	7	3	13	12
	11			
	15			
<b>vor</b>		2	9	10
<b>ZF (&gt;30d ZF)</b>	3	3	18	17
	7	3	14	13
	11	1	8	8
	15	1	5	6
<b>nach</b>	3	3	13	13
	7	3	13	14
	11	3	13	12
	15	2	9	9

**Tab. 2:** Anzahl (N) der mit Leptin behandelten Tiere (Lep) bzw. der Kontrolltiere (Ko), die für den Vergleich zwischen Veränderung der Leptinresponsivität bei erstmaligem (oben) und wiederholtem (unten) Angebot von Zusatzfutter sowie bei den jeweils vorausgehenden bzw. nachfolgenden Standardfutter-Perioden verwendet wurden (siehe Abb. 15 und 16). n=Anzahl der Versuchsgruppen.

Neben den selbst untersuchten Versuchsgruppen wurden zur Erhöhung der N-Zahl bei der Auswertung der Leptinresponsivität Datensätze von Gruppen aus einer parallel durchgeführten Diplomarbeit<sup>3</sup> mit einbezogen, bei denen Dauer und Zyklus des periodischen Zugangs zu Zusatzfutter denen der hier untersuchten Gruppen entsprachen. Dabei handelt es sich um 5 Versuchsgruppen im Alter zwischen 8 und 27 Wochen (N=47), die neben den selbst untersuchten Versuchsgruppen in Tab. 2 angegeben sind. Weiterhin wurde bei der Darstellung der Korrelation zwischen der über die beiden letzten Tage vor einer Leptinbehandlung gemittelten Körpermasse und der an diesen Tagen aufgenommenen

<sup>3</sup> Quelle: Diplomarbeit C. Daniel, Fachbereich Haushalts- und Ernährungswissenschaften, Universität Gießen 2002

Futtermenge auf Daten von 3 weiteren Versuchsgruppen (N=30, Alter zwischen 15 und 27 Wochen) aus der oben erwähnten Arbeit zurückgegriffen.

#### **2.5.6 Zehntägige Leptinbehandlung von Tieren mit diätinduzierter Adipositas bei 22°C während Zusatzfütterung**

Nachdem die Tiere aus Versuchsgruppe G im Anschluss an den Versuchszeitraum mit periodischer, sensorisch attraktiver Zusatzfütterung bei eintägigen Leptinbehandlungen eine diätinduzierte Adipositas mit Leptinresistenz aufwiesen, wurden sie abschließend während Fütterung von Standardfutter plus zwei Zusatzfuttersorten (ZF 1 + ZF 2) 10 Tage lang mit einer täglichen Dosis von  $2 \cdot 100 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  Leptin behandelt. Der der Injektionsphase vorausgehende Zeitraum von 5 Tagen diente als Referenzwert (=Vorlauf). Eine abschließende Bestimmung der Körperzusammensetzung konnte allerdings nicht durchgeführt werden, da die Tiere für neurobiologische Untersuchungen im Rahmen einer weiteren Studie perfundiert wurden.

## 2.6. DATENERHEBUNG

### 2.6.1 Bestimmung der Futteraufnahme

Die Futteraufnahme wurde täglich zu Beginn der Aktivitätsphase durch Wiegung bestimmt. Um eine Verfälschung der Wiegung durch Veränderung des Wassergehalts des Futters durch Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsunterschiede auszuschließen, wurde das verwendete Futter grundsätzlich bei den gleichen klimatischen Bedingungen gelagert, bei denen die Tiere gehalten wurden. Da zuvor in Versuchsreihe I bis III Fehlwerte bei der Ermittlung der Futteraufnahme aufgrund eines Substanzverlustes durch Krümel nicht ausgeschlossen werden konnten, wurden in Versuchsreihe IV Halterungen für Futterpellets verwendet, die in der Werkstatt des Max-Planck-Instituts, Bad Nauheim, angefertigt wurden (Abb. 1). Diese Kombination aus Halterung mit Auffanggefäß ermöglichte es, Messfehler durch Substanzverlust aufgrund von Krümeln äußerst gering zu halten.



**Abb. 1:** In der Werkstatt des Max-Planck-Instituts, Bad Nauheim, angefertigte Halterungen für das tägliche ad libitum Angebot des Standardfutters. A) frisch befüllte Halterung, B) von Einstreu gesäuberter Futterrest nach 24h. Durch das integrierte Auffanggefäß und die feste Anbringung der Futterpellets kann der Großteil der anfallenden Krümel (B) bei der Wiegung des Futterrestes mitberücksichtigt und so der Wiegefehler durch Substanzverlust minimiert werden.

### 2.6.2 Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs

Zur Ermittlung der Stoffwechselrate in Versuchsgruppe I bis III mittels indirekter Kalorimetrie wurden die Tiere einzeln in geschlossenen Kunststoffbehältern gehalten, die über eine Öffnung im Deckel verfügten, durch die ein Metallröhrchen zum Absaugen der Atemluft geführt wurde. Die Einzelkäfige befanden sich in einer Klimabox, die für eine konstante Temperatur und Luftfeuchtigkeit sorgte. Durch den verbleibenden Zwischenraum zwischen Absaugrohr und Käfigöffnung strömte Frischluft nach, es handelte sich also um eine Messung im offenen System (Withers et al. 1977). Sowohl aus der Umgebung (=Bezugswert), als auch aus 7 der Tierkäfige wurde kontinuierlich Luft mittels Membranpumpen abgesaugt, die durch mit  $\text{CaSO}_4$  (Drierite®, Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, BRD) gefüllte Röhren zur Trocknung, durch Aktivkohlefilter zur Extraktion organischer Bestandteile und zuletzt durch Membranfilter zum Abfangen von Staubpartikeln geleitet wurde. Mit einem Zeitgeber ausgestattete Magnetventile sorgten dafür, dass die Luft aus den 7 Tierkanälen bzw. dem Referenzkanal jeweils für einen Zeitraum von 5 min alternierend auf Messposition geschaltet und von einer weiteren Membranpumpe durch einen Massenflussmesser gesaugt wurde. Ein Teilstrom von etwa 100 ml/min wurde danach durch einen Kanal eines elektrochemischen 2-Kanal-Sauerstoffanalysators (S-3A/II, Ametek, Pittsburgh, USA) gesaugt, der Rest in die Umgebung entlassen. Die Luft der übrigen 7 Kanäle wurde während dieser Zeit ebenfalls aus dem System entlassen. Der zweite Kanal des  $\text{O}_2$ -Analysators maß ständig Umgebungsluft als Referenzwert, so dass durch Differenzbildung der Sauerstoffverbrauch des gerade gemessenen Tieres bestimmt werden konnte. Die zusätzlich zwischengeschaltete Messung von Umgebungsluft auf dem gleichen Kanal, mit dem die Tierluft analysiert wurde, ermöglichte es, eventuelle Veränderungen zwischen den beiden Analysatorkanälen zu erfassen. Die zweite für die Berechnung des  $\text{O}_2$ -Verbrauchs nötige Größe ist die Flussrate. Um Unterschiede in der Flussrate der abgesaugten Luft bei Käfigen in Mess- oder Bypass-Position zu vermeiden, befand sich zwischen den Nadel- und Magnetventilen pro Kanal jeweils ein Wassermanometer zur optischen Kontrolle der Flussrate, welches mehrmals täglich auf Konstanz kontrolliert und gegebenenfalls mit Hilfe des Nadelventils abgeglichen wurde. Die Flussrate betrug während aller Versuche 200-220 ml/min. Flussrate sowie Sauerstoffgehalt beider Analysatorkanäle in Kombination mit der Kennung des jeweils gemessenen Kanals wurden sowohl von einem Computer, als auch von einem Mehrkanal-Hybrid-Drucker (Yokowaga 3081, nbn Elektronik GmbH, Herrsching, BRD) aufgezeichnet. Die Kalibrierung des Sauerstoff-

analysators erfolgte vor Versuchsbeginn, den erwünschten Messbereich abdeckend, durch Eichgase mit definierter Sauerstoffkonzentration zwischen 20 und 21%. Zur Kalibrierung des Massenflussmessers wurde, nach Einstellung eines konstanten Luftflusses, die Zeit gestoppt, in der ein Seifenfilm eine definierte Strecke in einem Plexiglaszylinder mit bekanntem Volumen zurücklegte. Gleichzeitig wurden Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftdruck im Raum ermittelt und das Luftvolumen auf Standardbedingungen umgerechnet. Der errechnete Luftfluss wurde gegen die am Massenflussmesser eingestellte Spannung aufgetragen. Durch Wiederholung des Verfahrens bei verschiedenen Flussraten wurde eine Kennlinie ermittelt.

### **2.6.3 Berechnung der metabolischen Rate**

Von den 5-minütigen Messperioden in der oben beschriebenen Sauerstoffmessung wurden jeweils nur die letzten 2,5 Minuten ausgewertet, um Fehler durch Restluft aus dem zuvor analysierten Kanal auszuschließen. Während der Messung der Umgebungsluft wurde die Spannungsdifferenz zwischen dem Messkanal und dem Referenzkanal gleich Null gesetzt. Zwischen den somit im Abstand von 40 Minuten erscheinenden Nullwerten wurde eine Regression als Referenzlinie für den Sauerstoffverbrauch des jeweils zu messenden Tieres ermittelt. Aus der Spannungsdifferenz zwischen dem Tierluft-Messwert und der Referenzlinie wurde der Sauerstoffverbrauch unter Berücksichtigung der Flussrate in der jeweiligen Tierkammer bestimmt. Aufgrund der Zusammensetzung des Standardfutters wurde bei der Berechnung der metabolischen Rate ein respiratorischer Quotient von 0,85 und somit ein Umrechnungsfaktor von 0,34 W pro ml  $O_2 \cdot \text{min}^{-1}$  bzw. 20,4 J pro Liter  $O_2$  zugrunde gelegt.

### **2.6.4 Bestimmung der Körperzusammensetzung**

Zu Versuchsende wurden die Tiere unter Vermeidung von Stress in den ersten 4 Stunden der Lichtphase (folglich bei den mit Leptin behandelten Tieren etwa 15 Stunden nach der letzten Injektion) durch eine ca. 20-sekündige  $CO_2$ -Begasung narkotisiert, dekapitiert und entblutet. Um eine Verfälschung der Bestimmung der Körperzusammensetzung durch die noch im Verdauungstrakt befindliche Nahrung auszuschließen, ist eine Resektion des Magen-Darm-Traktes nötig. Zu diesem Zweck wurden Thorax und Abdomen entlang der Linea Alba eröffnet, abdominaler Ösophagus und distales Rektum durchtrennt und der Gastrointestinal-Trakt entnommen, nachdem er sorgfältig von intestinalem Fett und

Gekröse (welches im Tierkörper verblieb) befreit worden war. Die Harnblase wurde eröffnet und deren Inhalt außerhalb des Tierkörpers entleert, um die Bestimmung des Wassergehalts des Tierkörpers nicht zu beeinflussen. Die exentrierten Körper wurden, unter Berücksichtigung des Gewichtes des zuvor entnommenen Blutes, umgehend zur Bestimmung der Feuchtmasse gewogen und danach in Aluminiumschalen bis zur Gewichtskonstanz in einem Trockenschrank bei 75°C getrocknet. Aus der Differenz zwischen Feucht- und Trockenmasse konnte der Wassergehalt des Tierkörpers bestimmt werden. Nach der Trocknung wurden die Tierkörper in fettfreies, chloroformdurchlässiges Papier verpackt und, leicht zerkleinert, einer 24-stündigen Chloroform-Extraktion in einer Soxhlet-Apparatur (Merck-Eurolab, Frankfurt/Main, BRD) unterzogen. Die durch dieses Verfahren vollständig entfetteten Tierkörper wurden, unter sorgfältiger Vermeidung von Substanzverlust, ausgepackt und nochmals bei einer Temperatur von 75°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die ermittelten Endwerte werden als fettfreie Trockenmasse (FFDM = fat-free dry-mass) bezeichnet. Aus den ermittelten Werten für Feuchtmasse, Trockenmasse und fettfreie Trockenmasse wurden Körperwasser und Fettmasse sowie der prozentuale Wasser- und Fettgehalt der Feuchtmasse berechnet.

## **2.7 DATENAUSWERTUNG**

### **2.7.1 Allgemeine Angaben zur statistischen Auswertung**

Zur Regressionsgeraden-Bestimmung wurden Korrelationskoeffizienten durch gängige Standardverfahren, basierend auf der Methode der kleinsten Quadrate, ermittelt und auf ihre Verschiedenheit von Null getestet. Zum Vergleich zweier Regressionsgeraden, für den ein hauseigenes Programm herangezogen wurde, wurden die Regressionsgeraden zunächst auf Parallelität, anschließend gegebenenfalls auf Unterschiede im y-Achsenabschnitt überprüft (Brownlee, 1965). Varianzanalysen (ANOVA) zur Ermittlung von statistischen Unterschieden in Körperfettgehalt, Futteraufnahme und Körpermasse, sowie alle weiteren statistischen Tests wurden mit Hilfe des Programmes SigmaStat (SPSS Corporation, Chicago, USA) durchgeführt. Entsprechend der angewandten Testverfahren sind bei Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA arithmetische Mittel und bei Anwendung einer zweifaktoriellen ANOVA (mit den Faktoren Behandlung und Versuchsgruppe) gewichtete Mittel jeweils mit mittlerem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die

Normalverteilung (nach Kolmogorov-Smirnov) und die Varianz (Levene-Median-Test) der Gruppen wurden programmintern überprüft. War eine der Bedingungen nicht erfüllt, wurde die Rangordnung der Werte errechnet und die ANOVA mit diesen Rangwerten ausgeführt. Bei allen angewandten statistischen Verfahren wurde ein Signifikanzniveau von  $P < 0,05$  angenommen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen zwei zu vergleichenden Gruppen wurde in den Abbildungen durch \* für  $P < 0,05$ , \*\* für  $P < 0,01$  und \*\*\* für  $P < 0,001$  gekennzeichnet.

## **2.7.2 Spezielle Angaben zur Auswertung der Versuchsreihen**

### 2.7.2.1 Versuchsreihe I

Aufgrund der Bestimmung des Sauerstoffes des gleichen Tieres im 40-Minuten-Takt (siehe Ermittlung des  $O_2$ -Verbrauches), erhielt man pro Tier und Tag ca. 36 Messwerte, auf deren Basis die absolute und massenspezifische metabolische Rate bestimmt wurde. Aus den erhaltenen Werten wurden sowohl 24-Stunden-Mittelwerte (=ADMR) als auch 3-Stunden-Mittelwerte berechnet. Aus den 3-Stunden-Mittelwerten wurde pro Tier der niedrigste Wert (=Tagesminimum) und der höchste Messwert (=Tagesmaximum) eines Tages bestimmt, wobei die ersten 3 Stunden nach einer Temperaturänderung unberücksichtigt blieben. Aus diesen Werten wurde pro Tier ein Mittelwert für Tagesminimum und -maximum während jeder der 2-5 Tage dauernden Temperaturintervalle bei der gleichen  $T_a$  (=zeitliches Mittel) errechnet. Intervalle der gleichen  $T_a$ , die von mehreren Tagen bei anderer  $T_a$  unterbrochen wurden, wurden separat ausgewertet. Für die Futteraufnahme wurden entsprechende zeitliche Mittelwerte berechnet, von der täglich ermittelten Körpermasse der Tiere wurde jeweils nur der Wert am letzten Tag einer Temperaturperiode ausgewertet, um darzustellen, inwieweit sich die Körpermasse während der vorangegangenen Temperaturperiode verändert hatte.

### 2.7.2.2 Versuchsreihe II und III

Es wurden sowohl für die Kontroll- als auch für die Leptinbehandlungsgruppen aus der täglich bestimmten Futteraufnahme und Körpermasse sowie aus der ADMR Mittelwerte errechnet und für jeden Tag die Differenz zwischen beiden Gruppen gebildet. Zusätzlich wurde für die Futteraufnahme die Abweichung der Werte jedes Einzeltieres vom Kontrollmittel berechnet, um die Streuung der Daten deutlich zu machen. Aus diesen Differenzen

zum Kontrollmittel wurden für die Futteraufnahme jedes Tieres zeitliche Mittelwerte jeweils über den 5-tägigen Vorlauf und die 10-tägige Leptinbehandlungsperiode errechnet, wobei der erste Injektionstag, an dem sich der Leptineffekt erst entwickelte, sowie der Zeitraum zwischen der letzten Leptininjektion und der nach ca. 15 Stunden folgenden Tötung nicht berücksichtigt wurden. Eventuell bereits im Vorlauf bestehende Differenzen zwischen den Leptinbehandlungsgruppen wurden durch Subtraktion von der Differenz während der Behandlungsperiode berücksichtigt. Um die Beeinflussung der Körpermasse durch die Leptinbehandlung zu untersuchen, wurde die am letzten Tag des Vorlaufes ermittelte Körpermasse jedes Tieres mit der am letzten Behandlungstag verglichen. Für den Vergleich von Körpermasse, Futteraufnahme, ADMR und Körperzusammensetzung wurde innerhalb der *ad libitum* Fütterungsgruppe eine zweifaktorielle ANOVA mit den Faktoren Leptinbehandlung und Versuchsgruppe herangezogen. Da innerhalb der Fütterungsgruppe mit limitiertem Futterzugang nur eine Versuchsgruppe verwendet wurde, erfolgte dort die Auswertung mittels einer einfaktoriellen ANOVA. Auf einen statistischen Vergleich der Absolutwerte zwischen den beiden Fütterungsgruppen wurde verzichtet, da sie zeitlich getrennt unter Verwendung verschiedener Versuchsgruppen erhoben wurden (Döring 2000). Statt dessen wurden die prozentualen Änderungen der gemessenen Parameter in den beiden Fütterungsgruppen ermittelt, um die Abweichung von den Ausgangswerten zu beschreiben. Zur Untersuchung der Auswirkung der  $T_a$  auf die Futteraufnahme wurde innerhalb jeder Fütterungsgruppe sowohl für die Futteraufnahme als auch für die Abweichung vom Mittelwert der jeweiligen Kontrollen bei den mit Leptin behandelten Tieren eine einfaktorielle ANOVA verwendet. Die Auswertung von Leptin-effekten auf die Körperfettmasse, den Körperfettgehalt, die MR sowie die massenspezifische MR erfolgten analog zu der Futteraufnahme.

#### 2.7.2.3 Versuchsreihe IV

Aus vorhergehenden Versuchen war bekannt, dass sich die Wirkung einer eintägigen Leptinbehandlung mit der hier verwendeten Dosis auf die Futteraufnahme auf den Tag nach der Injektion (=Effektag) beschränkte (Döring 2000). Der an diesen Effektag anschließende zweitägige Nachlauf stellte in den meisten Fällen gleichzeitig den Vorlauf der folgenden Injektion dar. Es wurden bei Kontroll- und Leptinbehandlungsgruppe Mittelwerte ( $\pm$ SEM) für die täglich ermittelte Aufnahme jeder Futtersorte (in g und kJ) sowie deren Differenz zueinander errechnet. Zusätzlich wurden die Abweichungen der Einzelwerte vom Kontrollmittel an jedem Tag berechnet. Die Differenz zwischen diesen

Werten am Effekttag und dem "Vergleichswert" wurde innerhalb der mit Leptin behandelten Gruppe gemittelt und zur Beurteilung des Leptineffektes verwendet. Als Vergleichswert diente dabei ein Mittelwert über 4 Tage, und zwar die beiden Vorlauf-Tage vor der Injektion und die beiden dem Effekttag folgenden Nachlauf-Tage, an denen das Tier die gleiche Futterart erhielt wie am Injektionstag. Die am Injektionstag erhobenen Werte wurden von der Auswertung ausgeschlossen, da der größte Teil der Futteraufnahme dieses Tages bereits in der Aktivitätsperiode, also vor der ersten Injektion stattfand. Für die Darstellung des zeitlichen Verlaufs der von der Leptinbehandlung unbeeinflussten Futteraufnahme über die gesamte Versuchsdauer wurden Mittelwerte ausschließlich aus den zwei Vorlauftagen vor den jeweiligen Injektionen ermittelt. Zur Auswertung des zeitlichen Verlaufs des Körpergewichtes wurden die am Vortag einer Leptinbehandlung ermittelten Werte verwendet, um von der Leptinbehandlung unbeeinflusste Werte zu erhalten. Da bei den Injektionen jeweils verschiedene Tiere einer Versuchsgruppe mit Leptin behandelt wurden und auch die zu bestimmten Zeitpunkten nach einem Futterwechsel untersuchten Versuchsgruppen variierten, ist die Bedingung der Messwiederholung nicht erfüllt, so dass für die einzelnen Behandlungszeitpunkte unabhängige Tests durchgeführt wurden. Somit wurde bei der Beurteilung der Leptinwirkung auf die Futteraufnahme zu einem definierten Zeitpunkt eine zweifaktorielle ANOVA mit den Faktoren Versuchsgruppe und Leptinbehandlung durchgeführt. Da für Untersuchungen von Unterschieden in der Körpermasse zu verschiedenen Behandlungszeitpunkten mit unterschiedlichem Nahrungsangebot ausschließlich der von der Leptinbehandlung unbeeinflusste Wert am letzten Tag des Vorlaufs verwendet wurde, beruhte die statistische Auswertung hier auf einer einfaktoriellen ANOVA.

Während einer 10-tägigen Leptinbehandlung bei Tieren mit diätinduzierter Adipositas wurde anhand von Einzeltierwerten für Gesamtenergieaufnahme und Körpermasse jeweils die mittlere Abweichung ( $\pm$ SEM) der mit Leptin behandelten Tiere vom Mittelwert der Kontrollen errechnet. Zur Untersuchung einer möglichen Leptinwirkung auf die Gesamtenergieaufnahme wurden die Abweichungen der Einzeltiere vom Mittelwert der Kontrollen unter Berücksichtigung des eigenen Vorlaufs errechnet und mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA analysiert. Eine mögliche Beeinflussung der Körpermasse wurde unter Zuhilfenahme einer einfaktoriellen ANOVA untersucht, wobei die Differenzen der Einzeltierwerte zwischen Ende des Vorlaufs und Ende des Behandlungszeitraumes verwendet wurden.

Hinsichtlich der Fragestellung, ob und in wie weit die Leptinbehandlung selektiv die Aufnahme einer oder mehrerer der angebotenen Futtersorten verringert, wurde jeweils die Differenz der mittleren täglichen Aufnahme von ZF 1, ZF 2 und Standardfutter zwischen Vorlauf und Behandlungszeitraum gebildet und mit einer einfaktoriellen ANOVA untersucht.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 VERSUCHSREIHE I

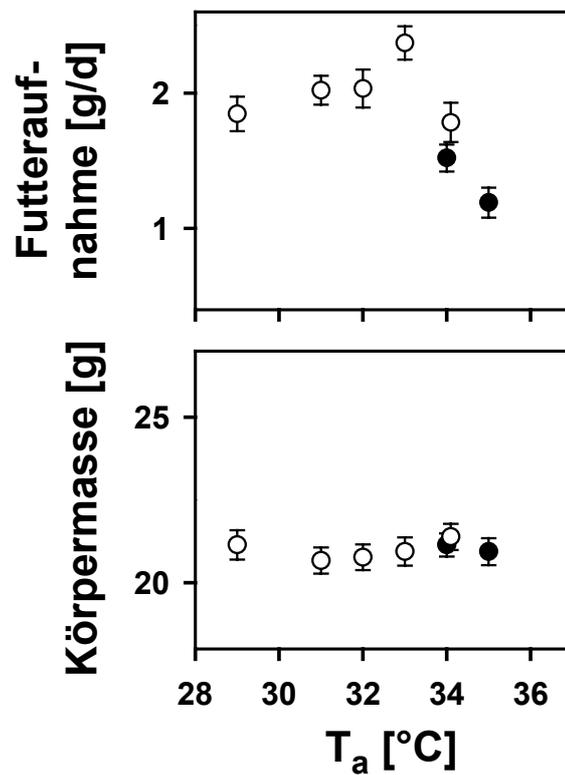
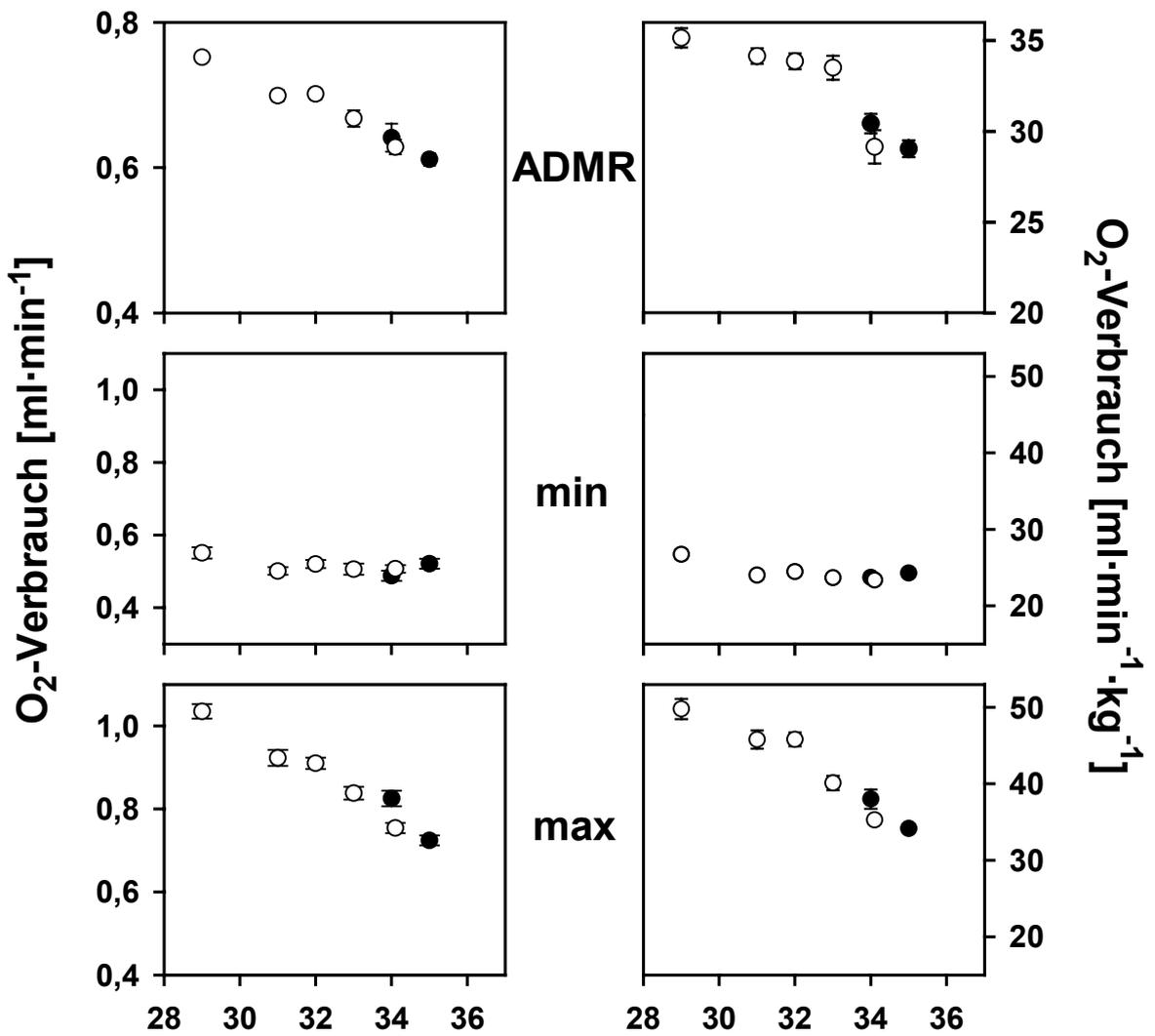
#### BESTIMMUNG DER THERMONEUTRALZONE

##### 3.1.1 Bestimmung der Thermoneutralzone während *ad libitum* Fütterung

Die vorliegenden Untersuchungen zur Determination der 24-h-TNZ bei C57Bl/6J-Mäusen basiert auf der Bestimmung von OKT und UKT, während die Tiere jeweils für 2-5 Tage der gleichen  $T_a$  ausgesetzt wurden. Dabei beinhaltet die Ermittlung der OKT eine weitaus komplexere Problematik als die der UKT, da die MR als alleiniges Kriterium dafür nicht ausreichend ist. Bei  $T_a$  zwischen 29 und 36°C dienten deshalb neben der ADMR und der massenspezifischen ADMR die Tagesminima und Tagesmaxima der MR und der massenspezifischen MR sowie die Futteraufnahme und die Körpermasse als Kriterien für die Ermittlung der OKT.

###### 3.1.1.1 Temperaturbereich 29-35°C (für 6 Wochen bei $T_a \geq 29^\circ\text{C}$ )

*Ad libitum* gefütterte Tiere im Alter von 15 Wochen (Abb. 2), die für 6 Wochen bei  $T_a$  zwischen 29 und 34°C gehalten worden waren, zeigten insgesamt, trotz eines Plateaus von  $0,70 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1} \text{ O}_2$  bei 31-32°C, mit ansteigender  $T_a$  in sehr guter Näherung eine lineare Reduktion der ADMR ( $y=-0,02x+1,4$ ,  $r=0,98$ ,  $P<0,001$ ). Eine Untersuchung der Mittelwerte durch einfaktorielle ANOVA zeigte damit übereinstimmend, dass sich der bei 29°C ermittelte Wert signifikant von allen zwischen 31° und 35°C ermittelten unterschied ( $P<0,01$ ). Der Wert bei 35°C war um ca. 5% niedriger als der zuvor bei 34°C ermittelte Wert, der Unterschied erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau. Die Ergebnisse für die massenspezifische ADMR waren tendenziell gleich, wobei sich mit ca.  $33 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ O}_2$  ein ausgeprägtes Plateau bei Werten von 31-33°C ergab, aber es auch hier zu einem generellen Absinken der Werte mit ansteigender  $T_a$  kam ( $y=-1,1x+68$ ,  $r = 0,90$ ,  $P<0,01$ ). Die ANOVA zeigte, dass die bei 29°C ermittelten Werte hier nur von denen bei 34°C und 35°C signifikant verschieden waren ( $P<0,001$ ).



**Abb. 2 (vorhergehende Seite):** Mittelwerte ( $\pm$ SEM) des massenspezifischen Sauerstoff-Verbrauches (rechts) und des Sauerstoff-Verbrauches pro Tier (links), sowie der Futteraufnahme und der Körpermasse bei ad libitum gefütterten Tieren in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur ( $T_a$ ) bei Versuchsgruppe A ( $N=7$ ) im Alter von 15 Wochen nach vorausgegangenen 6 Wochen bei  $T_a$  über  $29^\circ\text{C}$ . Für Sauerstoffverbrauch und Futteraufnahme wurden die Durchschnittswerte über Zeiträume von 2-5 Tagen bei gleicher  $T_a$  ausgewertet, die Körpermasse wurde am Ende des jeweiligen  $T_a$ -Intervalls bestimmt. (●) Werte bei ansteigender, (○) Werte bei fallender  $T_a$ -Änderung. Beim Sauerstoffverbrauch sind die mittlere tägliche metabolische Rate (ADMR), das Tagesminimum (min) und -maximum (max) gezeigt.

Die Veränderungen der Tagesmaxima der MR mit der  $T_a$  entsprachen denen der ADMR ( $y=-0,05x+2,5$ ,  $r=0,97$ ,  $P<0,001$ ). Der bei  $29^\circ\text{C}$  ermittelte Wert war auch hier signifikant höher als der bei  $31^\circ\text{C}$  ( $P<0,001$ ). Zusätzlich lag bei ansteigender  $T_a$ -Änderung der bei  $35^\circ\text{C}$  bestimmte Wert signifikant ( $P<0,001$ ) unter dem zuvor bei  $34^\circ\text{C}$  ermittelten. Bei fallender  $T_a$ -Änderung von  $35$  auf  $34^\circ\text{C}$  war der bei  $34^\circ\text{C}$  ermittelte Wert jedoch signifikant ( $P<0,05$ ) niedriger als zuvor bei der gleichen  $T_a$ , so dass kein signifikanter Unterschied zwischen  $35$  und  $34^\circ\text{C}$  mehr festzustellen ist. Dieser sogenannte Hysteresis-Effekt ist wesentlich deutlicher ausgeprägt als bei der ADMR, bei der der fallende Wert nur ca. 2% niedriger war als der ansteigende. Der Verlauf der Tagesmaxima der massenspezifischen MR ( $y=-2,8x+131$ ,  $r=0,96$ ,  $P<0,001$ ) entsprach tendenziell dem der Absolutwerte, der Unterschied zwischen den bei  $29^\circ$  und  $31^\circ\text{C}$  ermittelten Werte war hier jedoch nicht signifikant.

Die Tagesminima der MR blieben zwischen  $31$  und  $35^\circ\text{C}$  von der  $T_a$  unbeeinflusst auf einem Mittelwert von ca.  $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1} \text{ O}_2$ . Der Wert bei  $29^\circ\text{C}$  war auch hier signifikant ( $P<0,05$ ) höher als die bei  $31$  und  $34^\circ\text{C}$  ermittelten Werte, der Wert bei  $35^\circ\text{C}$  unterschied sich jedoch bei den Tagesminima nicht von dem zuvor bei  $34^\circ\text{C}$  ermittelten Wert. Die statistische Untersuchung der Tagesminima der massenspezifischen MR ergab entsprechende Ergebnisse, wobei der bei  $29^\circ\text{C}$  ermittelte Wert auch hier im Vergleich zu den Werten bei  $34$  und  $35^\circ\text{C}$  signifikant erhöht war ( $P<0,05$ ). Im Plateau zwischen  $31$  und  $35^\circ\text{C}$  ergab sich ein Mittelwert von ca.  $24 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ O}_2$ .

Die Futteraufnahme zeigte zwischen  $29$  und  $32^\circ\text{C}$  keine signifikanten Unterschiede und lag im Mittel bei ca.  $2 \text{ g}$ . Für den unerwartet hohen Wert bei  $33^\circ\text{C}$  kann eine Verfälschung der Futteraufnahme durch übermäßiges Krümeln nicht ausgeschlossen werden. Bei einem Ansteigen der  $T_a$  zunächst auf  $34$  und danach auf  $35^\circ\text{C}$  verringerte sich die Futteraufnahme jedoch jeweils um ca.  $0,5 \text{ g}$  gegenüber den Werten bei  $29-32^\circ\text{C}$ . Hierbei ist jedoch zu

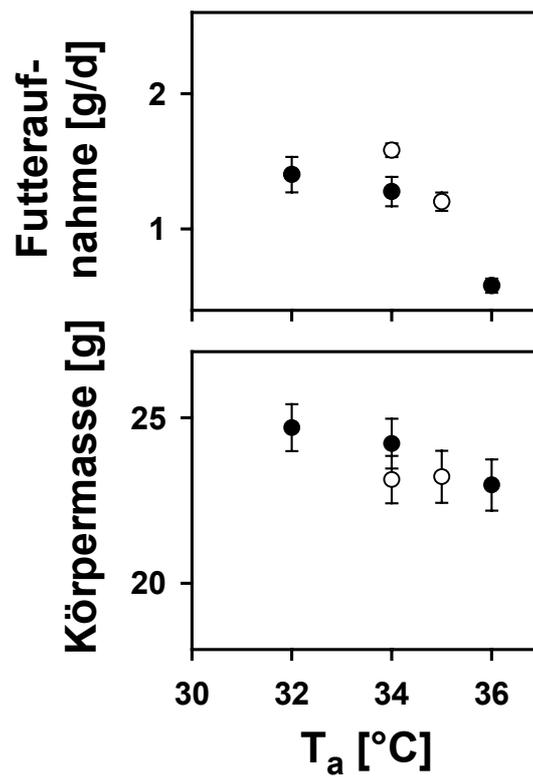
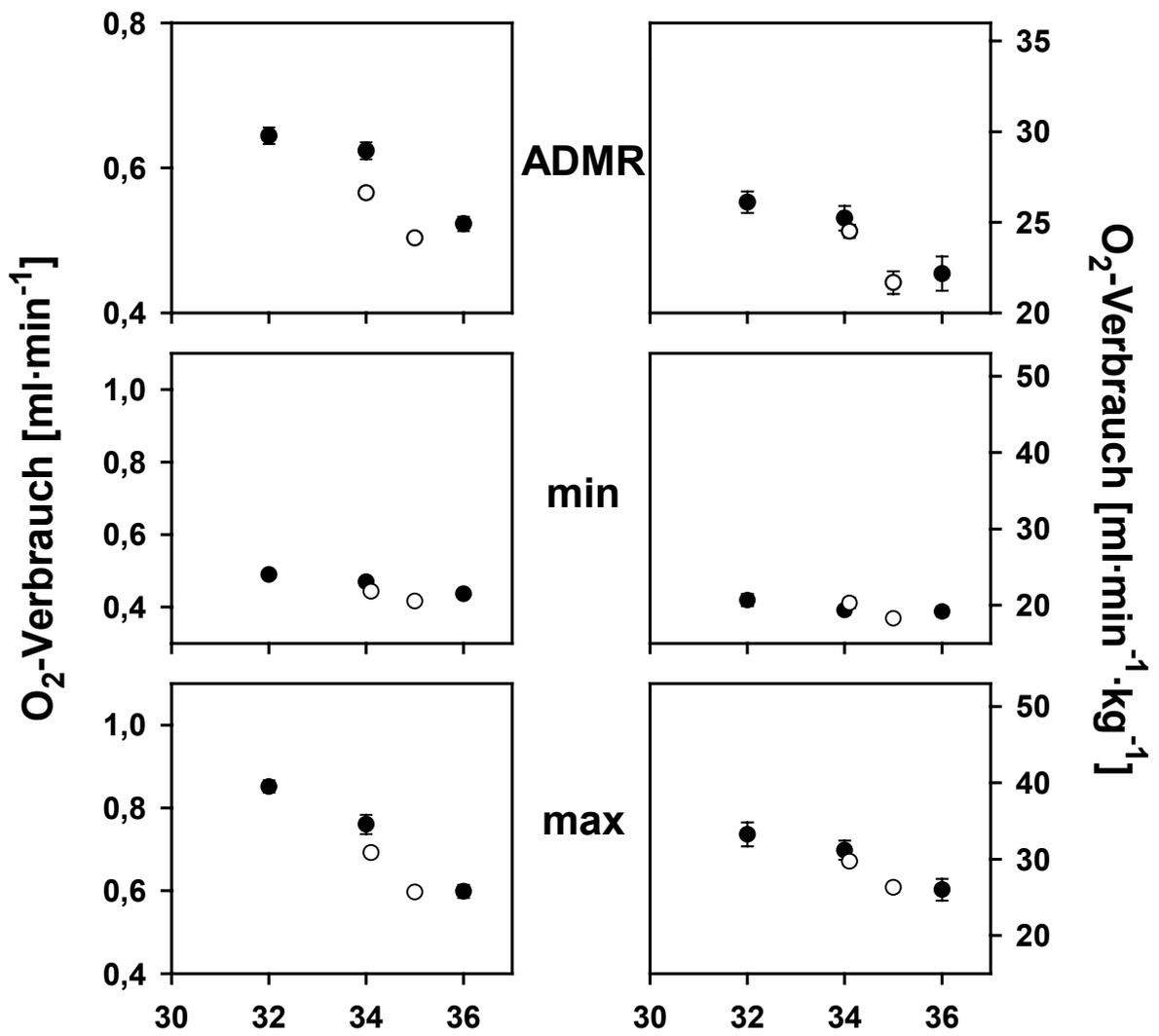
beachten, dass der 34°C-Wert in diesem Fall unmittelbar nach dem 29°C-Wert bestimmt wurde und die Messdauer abweichend von den anderen  $T_a$ -Perioden nur 24 h betrug. Bei fallender  $T_a$  lag der bei 34°C ermittelte Wert signifikant über dem 35°C-Wert ( $P < 0,001$ ) und unterschied sich nicht signifikant von den zwischen 29-32°C ermittelten Werten. Die Körpermasse blieb mit einem Mittel von ca. 21 g  $T_a$ -unabhängig, ausschließlich der 34°C-Wert während fallender  $T_a$ -Änderung war im Vergleich zu den bei 31 und 32°C ermittelten Werten signifikant ( $P < 0,05$ ) höher.

### *Fazit*

Der Abfall der ADMR zwischen 29 und 35°C entspricht dem Verlauf der Tagesmaxima der MR, während die Tagesminima der MR zwischen 31 und 35°C nicht von der  $T_a$  beeinflusst sind. Der signifikant erhöhte Wert nicht nur für die ADMR und die Tagesmaxima sondern auch für die Tagesminima der MR bei 29°C im Vergleich zu den zwischen 31 und 35°C ermittelten Werten weist auf eine thermoregulatorische Kompensation des erhöhten Wärmeverlustes bei Senkung der  $T_a$  hin und kennzeichnet somit klar die UKT zwischen 29 und 30,9°C. Aufgrund des fehlenden Anstieges der MR bei Erreichen der höchsten hier getesteten  $T_a$  ergibt sich kein Hinweis auf das Erreichen der OKT. Die Darstellung des zeitlichen Mittels der Futteraufnahme bei  $T_a$  von 34 und 35°C zeigt aber eine Reduzierung der Nahrungsaufnahme bei Messung mit ansteigender  $T_a$ , der die Reduktion der ADMR im gleichen  $T_a$ -Bereich übersteigt, obwohl es zu keinem signifikanten Abfall der Körpermasse kommt und ihr in fallender Folge gemessener 34°C-Wert sogar über dem in ansteigender  $T_a$ -Folge ermittelten liegt. Angesichts dieser teilweise widersprüchlichen Ergebnisse erschien zur Bestimmung der OKT eine Messwiederholung erforderlich.

#### 3.1.1.2 Temperaturbereich 32-36°C (seit 14 Wochen bei $T_a \geq 29^\circ\text{C}$ )

Nachdem die gleichen Tiere insgesamt 14 Wochen bei  $T_a$  zwischen 29 und 35°C gehalten wurden und inzwischen 23 Wochen alt waren, wurde die Ermittlung der OKT wiederholt (Abb. 3). Da bei der Wiederholung nur 3 verschiedene  $T_a$  in ansteigender Folge und nur zwei  $T_a$  bei fallender Folge untersucht wurden, konnte dieser Datensatz nicht durch Regressionsanalysen sondern nur mittels ANOVA sinnvoll ausgewertet werden.



**Abb. 3 (vorhergehende Seite):** Mittelwerte ( $\pm$ SEM) des massenspezifischen Sauerstoff-Verbrauches (rechts) und des Sauerstoff-Verbrauches pro Tier (links), sowie der Futteraufnahme und der Körpermasse bei ad libitum gefütterten Tieren in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur ( $T_a$ ) bei Versuchsgruppe A ( $N=7$ ) im Alter von 23 Wochen nach vorausgegangenen 12 Wochen bei  $T_a$  über 29°C. Für Sauerstoffverbrauch und Futteraufnahme wurden die Durchschnittswerte über Zeiträume von 2-5 Tagen bei gleicher  $T_a$  ausgewertet, die Körpermasse wurde am Ende des jeweiligen  $T_a$ -Intervalls bestimmt. (●) Werte bei ansteigender, (○) Werte bei fallender  $T_a$ -Änderung. Beim Sauerstoffverbrauch sind die mittlere tägliche metabolische Rate (ADMR), das Tagesminimum (min) und -maximum (max) gezeigt.

Bei dem Wiederholungsversuch zeigten die Tiere mit ansteigender  $T_a$  wiederum einen Abfall der ADMR, wobei sich diese von  $0,64 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1} \text{ O}_2$  bei 32°C um nur ca. 3% bei einer  $T_a$ -Erhöhung auf 34°C verringerte, während es zwischen 34 und 36°C zu einem Absinken der ADMR um 11% kam ( $P<0,001$ ). Bei den beiden 34°C-Werten zeigte sich ein ausgeprägter Hysteresis-Effekt, da der bei ansteigender  $T_a$  ermittelte Wert um ca. 10% höher ( $P<0,001$ ) war als der bei fallender  $T_a$ . Der Verlauf der massenspezifischen ADMR entsprach dem der ADMR. Beide Größen lagen deutlich unter den bei der gleichen  $T_a$  im ersten Versuchsdurchgang ermittelten Werten (vgl. Abb.2), so war z.B. der bei 32°C ermittelte Wert der massenspezifischen ADMR mit ca.  $26 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ O}_2$  um ca. 20% niedriger als im ersten Versuchsdurchgang.

In den Tagesmaxima der MR zeigte sich mit ansteigender  $T_a$  ebenfalls ein Abfall. Dabei war sowohl die Reduktion um ca. 10% bei einer Steigerung der  $T_a$  von 32 auf 34°C als auch die um ca. 20% zwischen 34 auf 36°C signifikant ( $P<0,01$ ). Dagegen lag der in fallender  $T_a$ -Folge gemessene Wert bei 35°C genauso niedrig wie der Wert bei 36°C und signifikant unter den bei 34°C gemessenen Werten ( $P<0,001$ ). Bei den beiden 34°C-Werten zeigte sich wiederum ein Hysteresis-Effekt, wobei der bei ansteigender  $T_a$  ermittelte Wert um ca. 10% höher ( $P<0,001$ ) war als der bei fallender  $T_a$ . Die Veränderungen der Tagesmaxima der massenspezifischen MR mit der  $T_a$  entsprachen tendenziell denen der Absolutwerte, wobei jedoch weder der Unterschied bei einem  $T_a$ -Anstieg von 32 auf 34°C, noch der bei einem Anstieg von 34 auf 36°C signifikant war.

Die Tagesminima der MR zeigten mit ansteigender  $T_a$  nur eine leichte Abwärtstendenz, wobei sich der Wert von ca.  $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1} \text{ O}_2$  bei 32°C sowohl bei einer Steigerung der  $T_a$  auf 34°C als auch bei einer weiteren Steigerung auf 36°C um jeweils ca. 5% verringerte. Der 32°C-Wert war signifikant ( $P<0,05$ ) höher als alle anderen Werte mit Ausnahme des in fallender Folge ermittelten 34°C-Wertes. Bei den beiden 34°C-Werten zeigte sich auch

hier ein Hysteresis-Effekt, wobei der bei fallender  $T_a$  ermittelte Wert ca. 5% niedriger war ( $P < 0,05$ ) als der bei ansteigender  $T_a$ . Der gleiche Befund ergab sich für die Tagesminima der massenspezifischen MR, wobei sich jedoch der bei 32°C ermittelte Wert von ca.  $21 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ O}_2$  nicht signifikant von dem bei 36°C unterschied.

Die Futterraufnahme der 23 Wochen alten Tiere in diesem zweiten Versuchsteil war mit 1,2-1,4 g zwischen 32 und 34°C erheblich niedriger als die der zuvor untersuchten 15 Wochen alten Tiere (vgl. Abb. 2) und verringerte sich bei 36°C signifikant um etwa 50% ( $P < 0,01$ ). Bei fallender  $T_a$ -Änderung lag die Futterraufnahme bei 34°C um ca. 25% höher als bei der gleichen  $T_a$  während ansteigender  $T_a$ -Veränderungen, ein Effekt, der bereits im ersten Versuchsdurchgang beobachtet wurde (vgl. Abb. 2), aber bei den älteren Tieren deutlich stärker ausgeprägt ist. Der bei 35°C in fallender Folge ermittelte Wert lag signifikant ( $P < 0,01$ ) über dem Wert bei 36°C, aber noch unter dem in ansteigender Folge bei 34°C ermittelten Wert.

Die Körpermasse zeigte bei 36°C eine signifikante Abnahme von ca. 5% im Vergleich zu dem zuvor bei 34°C ermittelten Wert. Bei fallender  $T_a$ -Änderung stagnierte die Körpermasse auf dem Wert, der sich zuvor bei 36°C eingestellt hatte, so dass sich der bei fallender  $T_a$ -Änderung ermittelte Wert bei 34°C signifikant von dem bei ansteigender  $T_a$ -Änderung bei der gleichen  $T_a$  ermittelten Wert unterschied ( $P < 0,001$ ).

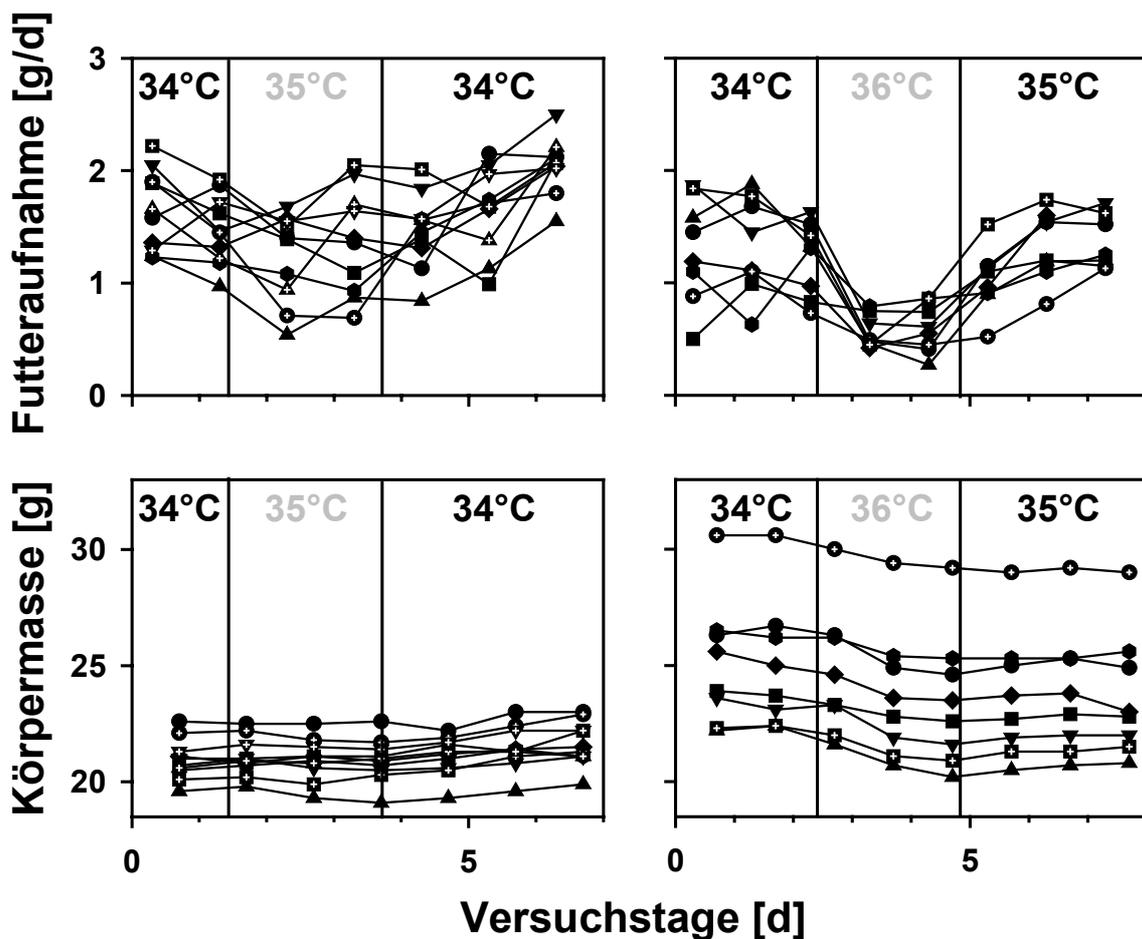
### *Fazit*

Die Wiederholung der Messung diente einer genaueren Untersuchung der OKT, nachdem die Befunde beim ersten Messdurchgang keine eindeutige Aussage ergeben hatten. Analog zu der bei jungen Tieren durchgeführten Untersuchung gibt es aus metabolischer Sicht aufgrund der mit ansteigender  $T_a$  sinkenden Stoffwechselfparameter keinen Hinweis auf ein Erreichen der OKT. Aufgrund der bei 36°C signifikant im Vergleich zu den übrigen  $T_a$  reduzierten Futterraufnahme, sowie der nachhaltig beeinflussten Körpermasse, erscheint die OKT der Tiere nach 14-wöchiger Haltung bei  $\geq 29^\circ\text{C}$  bei 36°C aber eindeutig überschritten zu sein. Andererseits zeigt die Messwiederholung, dass der in ansteigender Folge bei 34°C ermittelte Wert der Futterraufnahme nur eine geringe Abweichung von dem 32°C-Wert besitzt und sich somit eine  $T_a$  von 34°C innerhalb der 24-h-TNZ befindet, während es bei 32°C bereits zu einem Anstieg der Tagesminima der MR kommt. Da die in der Regel über mehrere Tage berechneten Mittelwerte jedoch zeitliche Änderungen verschleiern

könnten, ist die Betrachtung der Einzeltage im Zeitverlauf während der  $T_a$ -Änderungen im oberen kritischen Bereich erforderlich.

### 3.1.1.3 Zeitverlauf der Futteraufnahme und der Körpermasse im oberen kritischen $T_a$ -Bereich

Die Betrachtung des Zeitverlaufes (Abb. 4) zeigte, dass sich die Futteraufnahme bei den 15 Wochen alten Tieren am Tag nach dem Temperaturwechsel von 34 auf 35°C zunächst um ca. 25% reduzierte. Es handelte sich dabei allerdings nur um einen vorübergehenden Effekt, da am folgenden Tag die Futteraufnahme trotz gleichbleibend hoher  $T_a$  nur noch 13% unter den bei 34°C ermittelten Werten lag. Eine Auswirkung auf die Körpermasse war während dieser  $T_a$ -Änderungen nicht zu erkennen.



*Abb. 4: Verlauf der Futteraufnahme (oben) und der Körpermasse (unten) bei Versuchsgruppe A im Alter von 15 Wochen (links, N=10) und 23 Wochen (rechts, N=8) während Temperaturänderungen im oberen Grenzbereich. Einzeltiere sind durch unterschiedliche Symbole dargestellt, senkrechte Linien kennzeichnen den Zeitpunkt der Temperaturwechsel.*

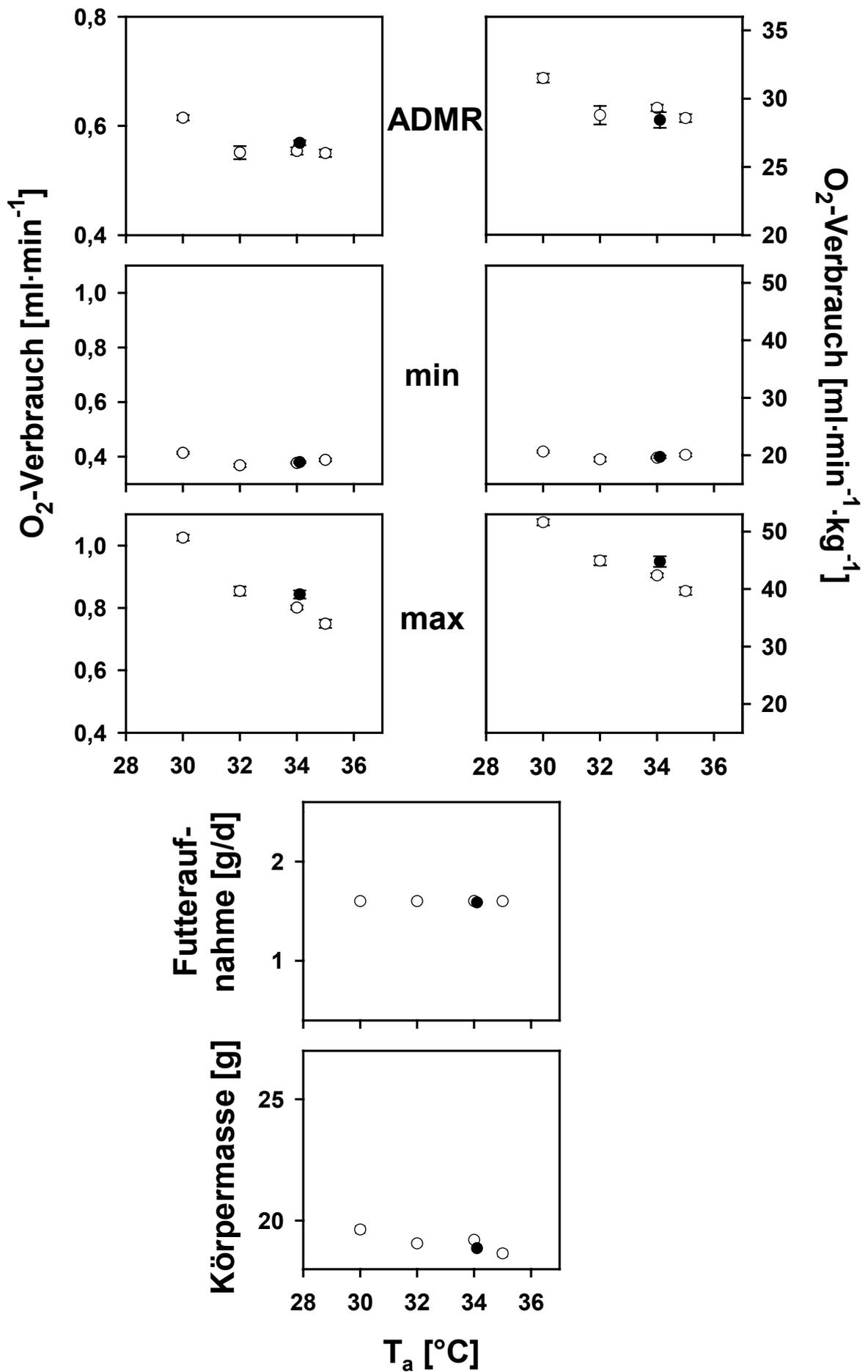
Im Gegensatz dazu kam es während des  $T_a$ -Anstieges von 34°C auf 36°C sowohl zu einer deutlich stärkeren als auch zu einer längerfristigen Futterreduktion bei der Versuchswiederholung mit den 23 Wochen alten Tieren, die sich auch nachhaltig auf die Körpermasse auswirkte. Nach Erhöhung der  $T_a$  von 34 auf 36°C sank die Futterraufnahme am folgenden Tag um ca. 40%. Die niedrigere Futterraufnahme wurde auch am darauf folgenden Tag beibehalten. Die Körpermasse reduzierte sich am Ende der 36°C-Periode im Vergleich zu der zuvor am Ende der 34°C-Periode ermittelten um ca. 5%. Bei dem nachfolgenden  $T_a$ -Abfall auf 35°C stieg der Futterkonsum dagegen innerhalb von 48 Stunden wieder auf die Ausgangsmenge an; es kam allerdings zu keinem erneuten Anstieg der Körpermasse.

### *Fazit*

Bei Erhöhung der  $T_a$  von 34 auf 35°C kommt es zu einer vorübergehenden Reduktion der Futterraufnahme, die jedoch keinen Einfluss auf die Körpermasse hat. Demgegenüber führt ein Anstieg der  $T_a$  von 34 auf 36°C zu einer längerfristigen starken Reduktion der Futterraufnahme, die auch einen nachhaltigen Effekt auf die Körpermasse hat und sich auch bei Reduzierung der  $T_a$  auf 35°C im Verlauf von 4 Tagen nicht normalisiert. Bei 35°C scheint also die OTK von *ad libitum* gefütterten C57Bl/6J-Mäusen erreicht zu werden.

### **3.1.2 Bestimmung der Thermoneutralzone während limitierten Futterzugangs**

Bei Überprüfung der Gültigkeit der in 3.1.1 ermittelten Ergebnisse bei 15 Wochen alten C57Bl/6J-Mäusen mit limitiertem Futterzugang, die seit 4 Wochen bei einer  $T_a$  von  $\geq 29^\circ\text{C}$  gehalten wurden, kommt es bei der Bestimmung der 24-h-TNZ aufgrund des mit ansteigender  $T_a$  prinzipiell sinkenden Futterbedarfs (siehe 3.2.5.1) zu einem methodischen Problem. Da nach jeder Senkung der limitierten Futtermenge jedesmal ein Eingewöhnungszeitraum von mehreren Tagen zur Stabilisierung der Körpermasse nötig wäre (Döring 2000), lässt sich eine, dem generellen Absinken der Futterraufnahme mit ansteigender  $T_a$  angepasste, parallele Reduzierung der limitierten Futtermenge nicht mit einer Veränderung der  $T_a$  innerhalb von 2-3 Tagen vereinbaren. Aus diesem Grund wurde der limitierte Futterzugang zu 1,6 g Standardfutter, 80% der von gleich alten Tieren in Versuchsgruppe A bei einer  $T_a$  von 29-32°C aufgenommenen Menge, während aller eingestellten  $T_a$  beibehalten, auch wenn dies jedoch nicht einem gleichmäßig stark limitierten Futterzugang entspricht.



**Abb. 5 (vorhergehende Seite):** Mittelwerte ( $\pm$ SEM) des massenspezifischen Sauerstoff-Verbrauches (links) und des Sauerstoff-Verbrauches pro Tier (rechts), sowie der Futteraufnahme und der Körpermasse bei Tieren mit limitiertem Futterzugang in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur ( $T_a$ ) bei Versuchsgruppe B ( $N=7$ ) im Alter von 15 Wochen nach vorangegangenen 4 Wochen bei  $T_a$  über  $29^\circ\text{C}$ . Für Sauerstoffverbrauch und Futteraufnahme wurden die Durchschnittswerte über Zeiträume von 2-5 Tagen bei gleicher  $T_a$  ausgewertet, die Körpermasse wurde am Ende des jeweiligen  $T_a$ -Intervalls bestimmt. (●) Werte bei ansteigender, (○) Werte bei fallender  $T_a$ -Änderung. Beim Sauerstoffverbrauch sind die mittlere tägliche metabolische Rate (ADMR), das Tagesminimum (min) und -maximum (max) gezeigt.

Unabhängig von dem temperaturabhängigen Verlauf der untersuchten Parameter zeigen sich generelle Unterschiede in den absoluten Werten zwischen den Tieren mit limitiertem Futterzugang und den Tieren mit *ad libitum* Fütterung. So unterschritt die massenspezifische ADMR der Tiere mit limitiertem Futterzugang (Abb. 5) aus Versuchsgruppe B im Alter von 15 Wochen die der *ad libitum* gefütterten Tiere aus Versuchsgruppe A im gleichen Alter (vgl. Abb. 2) durchschnittlich um 10%, wobei sich die Differenz mit ansteigender  $T_a$  verringerte. Ferner wiesen die Tiere als Folge des limitierten Futterzugangs bei allen  $T_a$  eine um ca. 10% niedrigere Körpermasse auf als Versuchsgruppe A im gleichen Alter.

Bei der Versuchsgruppe mit limitiertem Futterzugang lag die ADMR zwischen  $32^\circ$  und  $35^\circ\text{C}$  bei einem Wert von ca.  $0,55 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1} \text{ O}_2$ , wobei der  $32^\circ\text{C}$ -Wert um etwa 20% niedriger war als der der gleich alten, *ad libitum* gefütterten Tiere. Der bei  $30^\circ\text{C}$  ermittelte Wert bei limitiertem Futterzugang lag etwa 10% über den bei den übrigen  $T_a$  ermittelten ( $P<0,001$ ). Bei  $34^\circ\text{C}$  war der bei fallender  $T_a$ -Änderung ermittelte Wert wiederum etwas, jedoch nicht signifikant, niedriger als der bei ansteigender  $T_a$ -Änderung ermittelte. Die Veränderungen der massenspezifischen ADMR entsprachen tendenziell denen der ADMR, wobei der Unterschied zwischen dem  $30^\circ\text{C}$ -Wert und den übrigen  $T_a$  das Signifikanzniveau jedoch nicht erreichte. Auch die massenspezifische ADMR von ca.  $29 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ O}_2$  bei  $32^\circ\text{C}$  lag bei den Tieren mit limitiertem Futterzugang etwa 15% unter der von gleich alten *ad libitum* gefütterten Mäusen.

Die Tagesmaxima der MR zeigten, trotz eines Plateaus der Werte zwischen  $32$  und  $34^\circ\text{C}$ , mit ansteigender  $T_a$  in guter Näherung eine lineare Reduktion der ADMR ( $y=-0,05+2,5$ ,  $r=0,95$ ,  $P<0,05$ ). Dabei zeigte der Mittelwertsvergleich, dass der  $30^\circ\text{C}$ -Wert höher war als alle zwischen  $32^\circ$  und  $35^\circ\text{C}$  ermittelten Werte ( $P<0,001$ ). Bei  $34^\circ\text{C}$  war der bei fallender  $T_a$ -Änderung ermittelte Wert signifikant ( $P<0,05$ ) geringer als der bei ansteigender

$T_a$ -Änderung ermittelte. Die Ergebnisse bei der Analyse der massenspezifischen Tagesmaxima entsprachen denen der Absolutwerte ( $y=-2,1x+113$ ,  $r=0,94$ ,  $P<0,05$ ).

Die Tagesminima der MR lagen bei einer  $T_a$  zwischen 32° und 35°C von der  $T_a$  unbeeinflusst bei einem Mittelwert von ca. 0,38 ml·min<sup>-1</sup>. Der bei 30°C ermittelte Wert war im Vergleich zu allen übrigen  $T_a$  signifikant höher ( $P<0,05$ ). Ein Hysteresis-Effekt bei 34°C zeigte sich hier nicht. Die Veränderungen der Tagesminima der massenspezifischen MR entsprachen tendenziell denen der Absolutwerte mit der Ausnahme, dass der 5%ige Anstieg bei 30°C im Vergleich zu den übrigen  $T_a$  nicht signifikant war. Für das Plateau zwischen 32 und 35°C ergab sich ein Mittelwert von ca. 20 ml·min<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup> O<sub>2</sub>.

Die Futtermenge von 1,6 g wurde während aller untersuchten  $T_a$  vollständig aufgenommen, wobei diese Menge in etwa der Futteraufnahme von gleich alten *ad libitum* gefütterten Tieren aus Versuchsgruppe A bei einer  $T_a$  von 34°C entsprach. Bei 35°C nahmen die Tiere mit limitiertem Futterzugang sogar ca. 35% mehr Futter als die *ad libitum* gefütterten auf. Ihre Körpermasse bei 30°C war signifikant höher als bei allen anderen  $T_a$  ( $P<0,05$ ). Der Wert bei 35°C war im Vergleich zu allen übrigen  $T_a$ , mit Ausnahme der bei ansteigender  $T_a$ -Veränderungen ermittelten Werte bei 34°C, reduziert ( $P<0,05$ ).

### Fazit

Bei den Tieren mit limitiertem Futterzugang geht die signifikante Erhöhung der ADMR bei 30°C im Vergleich zu den übrigen höheren  $T_a$  sowohl mit einem stufenweisen Anstieg der Tagesmaxima der MR als auch mit dem abrupten Anstieg der Tagesminima bei 30°C parallel. Die Steigerung der minimalen MR bei 30°C kennzeichnet dabei zweifelsfrei die UKT. Aufgrund des fehlenden Anstieges der MR bei Erreichen der höchsten hier getesteten  $T_a$  ergibt sich kein Hinweis auf das Erreichen der OKT. Im Gegensatz zu den *ad libitum* gefütterten Tieren zeigt sich auch keine Reduktion in der Futteraufnahme, so dass die Abnahme der Körpermasse bei 35°C schwer zu beurteilen ist. Auch wenn eine klare Begrenzung der TNZ nach oben hin aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht erfolgen kann, kann sicher davon ausgegangen werden, dass der  $T_a$ -Bereich zwischen 32 und 34°C für die Tiere mit limitiertem Futterzugang innerhalb ihrer 24-h-TNZ liegt.

Für die bei Thermoneutralität durchzuführenden Untersuchungen ergibt sich somit zusammenfassend, dass bei Tieren, die bereits mehrere Wochen bei hohen  $T_a$  gehalten worden waren, bei beiden Fütterungsarten bei einer  $T_a$  von 32°C die UKT erreicht oder

überschritten ist. Hinsichtlich der oberen Begrenzung der TNZ kann davon ausgegangen werden, dass die  $T_a$  von 35°C bei *ad libitum* Fütterung einen Grenzwert darstellt, der auch bei limitiertem Futterzugang an oder geringfügig unter der OKT liegt. Um für die nachfolgenden Untersuchungen eine Aktivierung von Kälteabwehrreaktionen auszuschließen, wurde deshalb eine  $T_a$  von 34°C gewählt, als die höchste  $T_a$ , bei der sich die Tiere beider Fütterungsgruppen mit Sicherheit oberhalb der UKT befanden und sich noch keine Hinweise auf Hitzestress, also auf ein Überschreiten der OKT, ergaben.

### **3.2 VERSUCHSREIHE II & III**

#### **ZEHNTÄGIGE LEPTINBEHANDLUNG BEI *AD LIBITUM* ODER LIMITIERTER FÜTTERUNG VON STANDARDFUTTER UNTER THERMONEUTRALEN BEDINGUNGEN**

Zur Ermittlung der Leptinwirkung auf die Körperzusammensetzung unter thermoneutralen Bedingungen wurden bei einer  $T_a$  von 34°C sowohl bei *ad libitum* Fütterung als auch bei limitiertem Futterzugang 10-tägige Leptinbehandlungen mit einer Dosis von 200 pmol·g<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> durchgeführt, denen ein 5-tägiger Vorlauf vorausging. Im Vorfeld dieser Langzeitversuche stand den Tieren ein Zeitraum von ca. 6-8 Wochen zur Verfügung, in denen sie die Möglichkeit hatten, sich bis zum Erreichen stabiler Ausgangsbedingungen an die Einzelhaltung und die klimatischen Verhältnisse zu gewöhnen (=Eingewöhnungszeitraum). Innerhalb dieses Zeitraumes wurden zur Kontrolle täglich die Körpermasse und die Futteraufnahme bestimmt. Bei Versuchsgruppen mit limitiertem Futterzugang diente der Eingewöhnungszeitraum gleichzeitig der schrittweisen Futterlimitierung, bis nach anfänglicher Reduktion der Körpermasse eine Futtermenge erreicht war, die bei konstant niedriger Körpermasse gerade den energetischen Erhaltungsbedarf der Tiere deckte. Am Ende dieses Eingewöhnungszeitraumes erfolgte die Einteilung der Tiere in die Leptin- bzw. Kontroll-Behandlungsgruppe.

#### **3.2.1 Problematik bei der Festlegung einer geeigneten limitierten Futtermenge**

Als Bewertungskriterien für die Verabreichung einer angemessenen Futtermenge im Rahmen des limitierten Futterzugangs wurde einerseits die vollständige Aufnahme des

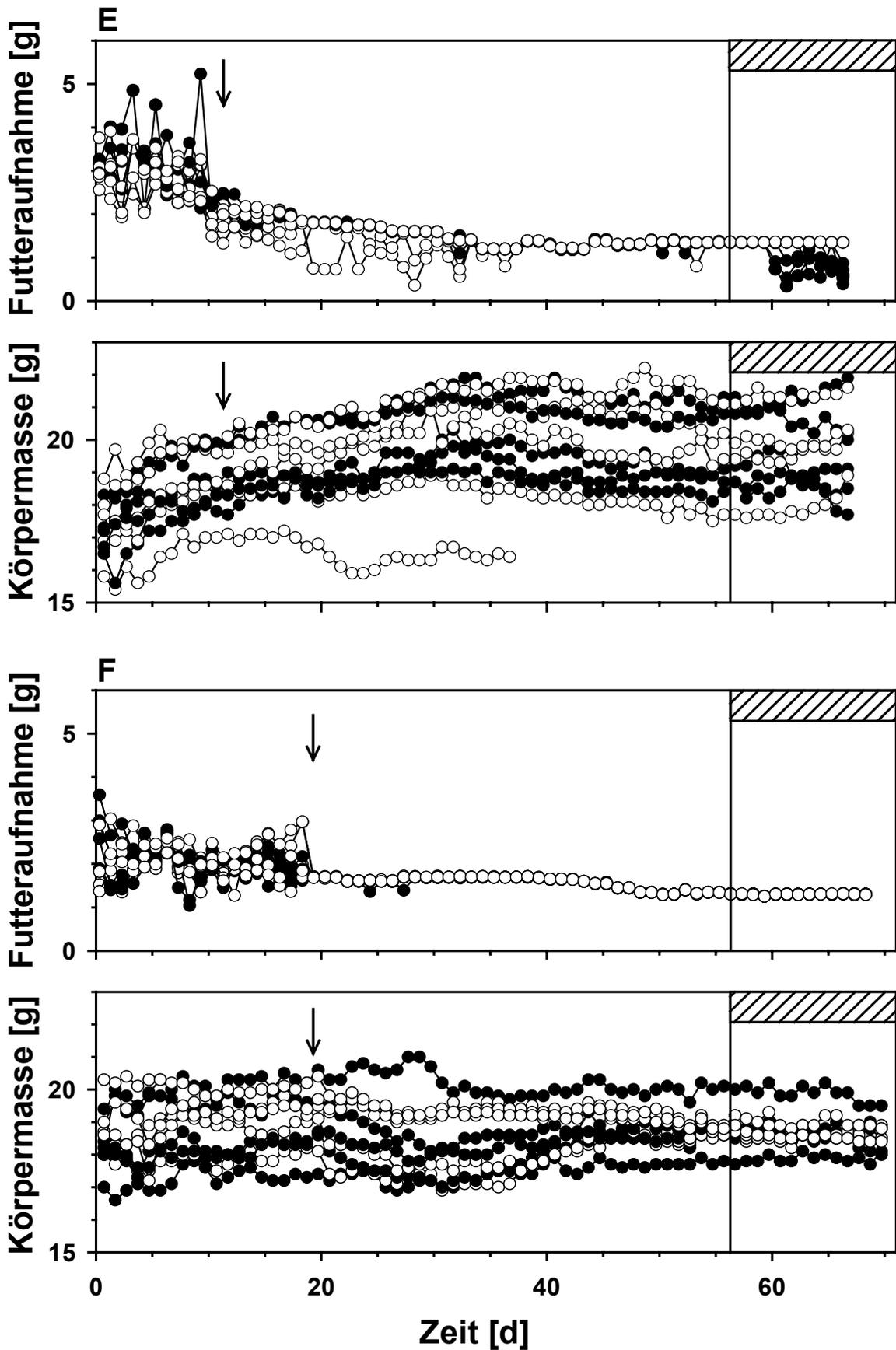
angebotenen Futters und andererseits das Erreichen einer für adulte Mäuse im unteren physiologischen Grenzbereich liegenden konstanten Körpermasse verwendet. Aufgrund von Erfahrungen in vorhergehenden Untersuchungen (Döring 2000), wurde darauf geachtet, eine Körpermasse von 17 g nicht zu unterschreiten (=kritische Körpermasse).

Abb. 6 zeigt anhand der zwei Versuchsgruppen E & F aus Versuchsreihe III, die zu Versuchsbeginn ca. 9 Wochen alt waren, die Entwicklung der Körpermasse und den Verlauf der Futteraufnahme im 50-tägigen Eingewöhnungszeitraum bei 34°C während allmählich zunehmender Futterrestriktion. Obwohl die zugeteilte Futtermenge in beiden Versuchsgruppen ähnlich war, ließen in Versuchsgruppe E verschiedene Tiere immer wieder Futterreste übrig. Ein Einzeltier in Versuchsgruppe E wies bei unauffälligem Verhalten und einer nicht vom Mittelwert der übrigen Tiere abweichenden Futteraufnahme eine ungewöhnlich niedrige Körpermasse auf und wurde deshalb ab dem 36. Tag des Eingewöhnungszeitraumes von der weiteren Versuchsauswertung ausgeschlossen.

Bei Versuchsgruppe E ist zu erkennen, dass die Tiere trotz allmählicher Futterlimitierung von ca. 2 auf 1,5 g zwischen dem 12. und dem 30. Tag des Eingewöhnungszeitraumes eine ansteigende Tendenz in ihrer Körpermasse zeigten ( $20,3 \pm 0,4$  g vs.  $19 \pm 0,3$  g, N=9). Danach kam es bei Futterlimitierung auf etwa 1,4 g Standardfutter zu einer leichten Absenkung der mittleren Körpermasse auf  $19,7 \pm 0,4$  g. Ab dem ca. 46. Tag des Eingewöhnungszeitraumes befand sich die Körpermasse dieser Versuchsgruppe bei einer Futterlimitierung auf 1,4-1,3 g Standardfutter auf einem relativ konstanten Mittelwert von ca.  $19,8 \pm 0,5$  g, wobei die Extremwerte zu Beginn des Vorlaufes bei 17,7 und 21,8 g lagen. Während des Vorlaufes und des Behandlungszeitraumes betrug die verabreichte Futtermenge konstant 1,35 g.

In Versuchsgruppe F erfolgte eine Futterlimitierung auf 1,7 g ab dem 19. Tag des Eingewöhnungszeitraumes, worauf sich die ursprünglich mittlere Körpermasse von  $19,2 \pm 0,3$  g innerhalb einer Woche auf ein Mittel von  $18,4 \pm 0,4$  g verringerte und dort stagnierte. Dabei trat die Senkung der Körpermasse bei dem schwersten Tier dieser Gruppe um eine Woche verzögert auf. Während der schrittweisen Reduzierung der bis zu diesem Zeitpunkt verabreichten Futtermenge von 1,7 g auf eine Futtermenge von 1,3 g zwischen dem 40. und 53. Tag stellte sich eine mittlere Körpermasse von  $18,9 \pm 0,2$  g ein, wobei die Extremwerte zu Beginn des Vorlaufes des 10-tägigen Behandlungszeitraumes bei 17,8 und 20,1 g lagen. Während des Vorlaufes und des Behandlungszeitraumes betrug die verabreichte

Futtermenge weiterhin 1,3 g, was analog zu Versuchsgruppe E ca. 75% der Futtermenge *ad libitum* gefütterter Tiere entsprach.



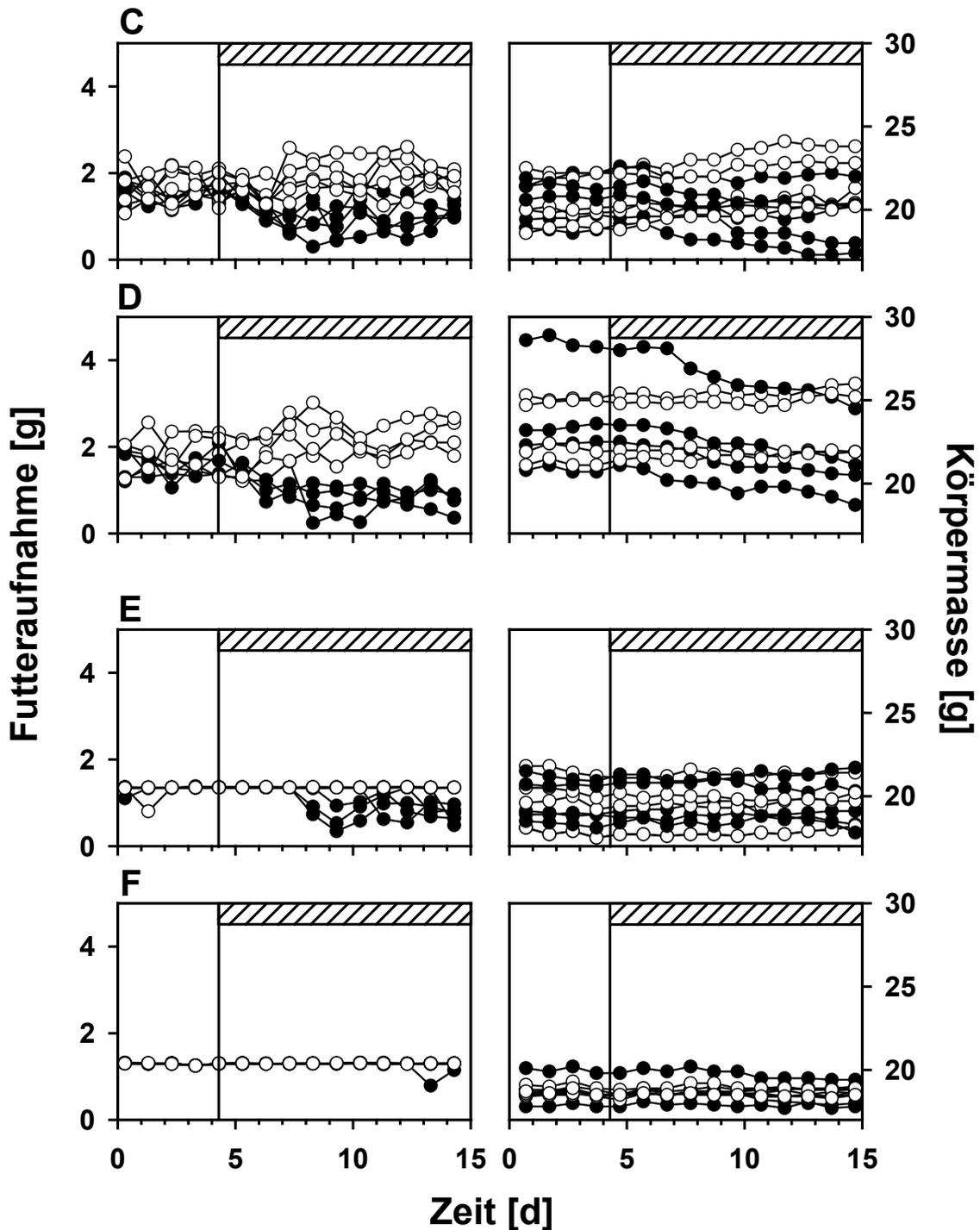
**Abb. 6 (vorhergehende Seite):** Verlauf von Futteraufnahme und Körpermasse während schrittweiser Futterreduktion in der Eingewöhnungsphase und während der anschließenden 10-tägigen Leptinbehandlung (schraffierter Balken). (●) mit Leptin behandelte Tiere, (○) Kontrolltiere. **Oben:** unzureichend limitierte Fütterung (Gruppe E, N=10); **unten:** limitierte Fütterung (Gruppe F, N=10). Die Pfeile markieren den Beginn der Futterlimitierung.

Am Ende der Eingewöhnungsphase lag die mittlere Körpermasse der Tiere aus Versuchsgruppe E 5% über der aus Versuchsgruppe F und die Standardabweichung war fast doppelt so groß. Die Futtermenge war während des Vorlaufes und des Behandlungszeitraumes bei Versuchsgruppe E um 4% höher als bei Versuchsgruppe F. Obwohl keiner der angegebenen Unterschiede das Signifikanzniveau erreicht, ist rückblickend bei einem Vergleich dieser beiden Versuchsgruppen davon auszugehen, dass es sich bei Versuchsgruppe E um eine unzureichende Limitierung der Futtermenge handelte. Einen Hinweis darauf stellen auch die in Eingewöhnungszeitraum und Vorlauf von mehreren Tieren aus Versuchsgruppe E in unregelmäßigen Abständen übriggelassenen Futterreste und die tendenziell ansteigende Körpermasse im Versuchsverlauf dar, die in Versuchsgruppe F nicht auftreten. Im folgenden werden deshalb zwar die Daten von Versuchsgruppe E mit dargestellt, doch beschränkt sich die statistische Auswertung des Leptineffektes bei limitiertem Futterzugang auf Versuchsgruppe F.

### 3.2.2 Leptinwirkung auf die Futteraufnahme und die Körpermasse bei *ad libitum* Fütterung und limitiertem Futterzugang unter thermoneutralen Bedingungen

Innerhalb der *ad libitum* gefütterten Versuchsgruppen C und D (Abb. 7, oberer Teil) war während der Behandlungsperiode eine Reduktion der Futteraufnahme und der Körpermasse zu erkennen. Bei Tieren mit ausreichend limitiertem Futterzugang (Versuchsgruppe F, Abb. 7 unten) hingegen kam es zu keinem Leptineffekt auf die Futteraufnahme und nur zu einer allenfalls minimalen Reduktion der Körpermasse; die reduzierte Futteraufnahme am 9. Behandlungstag beruhte ausschließlich auf einem Einzeltier, das die angebotene Futtermenge nicht vollständig aufnahm. Im Gegensatz dazu nahm in Versuchsgruppe E, die 4% mehr Futter als Versuchsgruppe F erhielt, bereits ab dem 3. Behandlungstag eine mit der Behandlungsdauer wachsende Anzahl von Einzeltieren die rationierte Futtermenge von 1,35 g nicht mehr vollständig auf, bis am 10. Behandlungstag alle Tiere Futterreste von bis zu 0,87 g übrig ließen. Die Körpermasse bei 3 der insgesamt 5 mit Leptin behandelten Tiere zeigte damit übereinstimmend gegen

Ende der Behandlungsperiode eine leichte Abwärtstendenz mit einer mittleren Reduktion um ca. 0,5 g.



**Abb. 7:** Verlauf von Futtermittelaufnahme (links) und Körpermasse (rechts) während 5-tägigem Vorlauf und 10-tägiger Leptinbehandlung (schraffierter Balken). (●) mit Leptin behandelte Tiere, (○) Kontrolltiere. **Oben:** ad libitum Fütterung (Gruppe C, N=10, und D, N=8); **Mitte:** unzureichend limitierter Futterzugang (Gruppe E, N=10); **unten:** limitierter Futterzugang (Gruppe F, N=10). Dass bei der Darstellung der Futtermittelaufnahme der Versuchsgruppen E und F bei den Kontrolltieren nur eine Linie erkennbar ist, beruht auf

der vollständigen Aufnahme der limitierten Futtermenge durch alle Tiere. Während der Leptinbehandlung lassen nur 4 Tiere (E) bzw. 1 Tier (F) zeitweise Futter übrig.

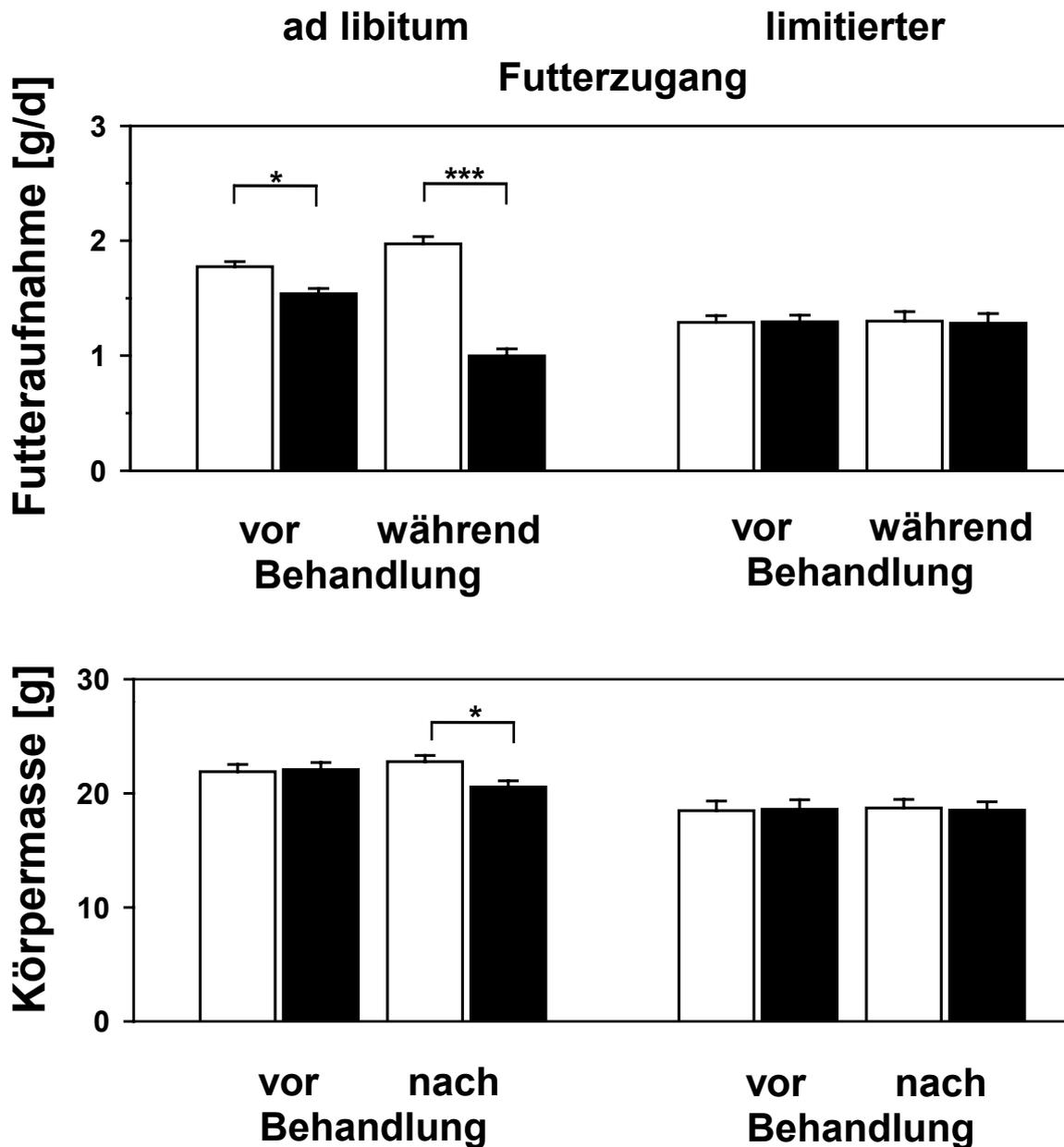


Abb. 8: Mittelwerte ( $\pm$ SEM) der durchschnittlichen täglichen Futteraufnahme während 5-tägigem Vorlauf und 10-tägiger Leptinbehandlung (oben) sowie der Körpermasse zu Beginn und am Ende des Behandlungszeitraumes (unten). (●) mit Leptin behandelte Tiere, (○) Kontrolltiere. **Links:** ad libitum Fütterung (Versuchsgruppe C und D, N=14); **rechts:** limitierter Futterzugang (Versuchsgruppe F, N=7). Die statistische Auswertung erfolgte bei ad libitum Fütterung mittels zweifaktorieller ANOVA (mit den Faktoren Behandlung und Versuchsgruppe) und bei limitiertem Futterzugang mittels einfaktorieller ANOVA, so dass sich entsprechend gewichtete und arithmetische Mittelwerte ergaben. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet: \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

Der Vergleich des zeitlichen Mittels der Futteraufnahme in der Vorlauf- und Behandlungsperiode (Abb. 8, oben) und der Körpermasse am Anfang und Ende der

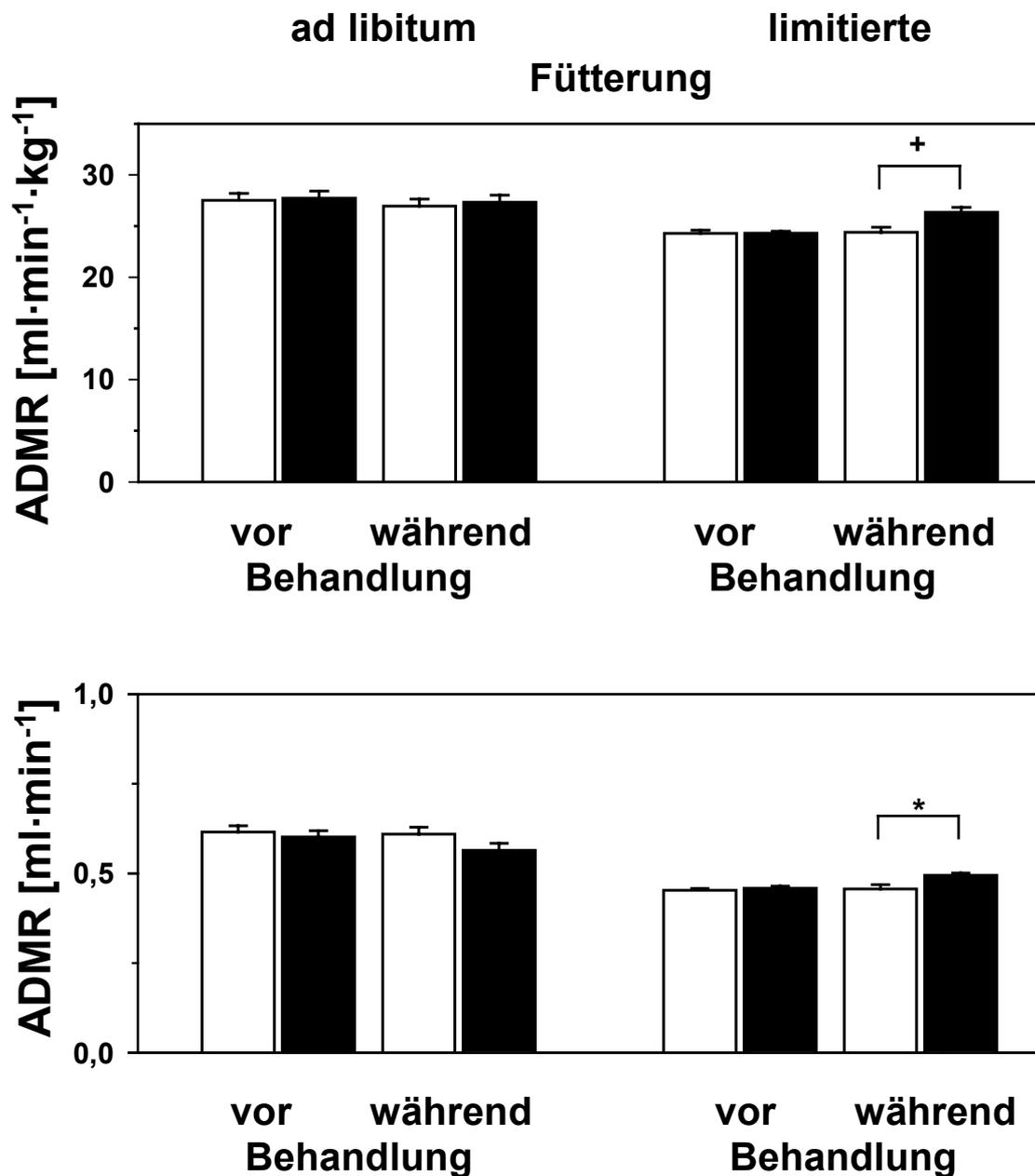
Behandlungsperiode (Abb. 8, unten) mittels ein- (limitierter Futterzugang) bzw. zweifaktorieller (*ad libitum* Fütterung) ANOVA zeigte, dass trotz der angestrebten gleichmäßigen Verteilung der Tiere auf die Leptin- bzw. Kontroll-Behandlungsgruppen, während *ad libitum* Fütterung bereits initial ein signifikanter ( $P < 0,05$ ) Unterschied im zeitlichen Mittel der Futterraufnahme bestand. Während der Behandlungsperiode zeigten die mit Leptin behandelten Tieren eine signifikante Abnahme des zeitlichen Mittels der Futterraufnahme von ca. 50% ( $P < 0,001$ ) im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe, deren zeitliches Mittel der Futterraufnahme sich im Vergleich zum eigenen Vorlauf sogar noch um ca. 11% erhöhte. Dadurch kam es zu einer deutlichen Vergrößerung des Unterschiedes zwischen den beiden Behandlungsgruppen. Selbst wenn die im Behandlungszeitraum ermittelte Differenz mit der Differenz von -14% zwischen mit Leptin behandelte- und Kontrollgruppe aus dem Vorlauf korrigiert wird, ergibt sich während der Leptinbehandlung immer noch ein signifikanter Unterschied ( $P < 0,001$ ) zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

Die Tiere mit ausreichend limitiertem Futterzugang aus Versuchsgruppe F erhielten vor Beginn des Behandlungszeitraumes ca. 30% weniger Futter als die Kontrolltiere der *ad libitum* gefütterten Gruppe. Bei limitiertem Futterzugang wurde weder im Vorlauf noch während des Behandlungszeitraumes ein Unterschied im zeitlichen Mittel der Futterraufnahme zwischen den beiden Behandlungsgruppen registriert. Ein Vergleich der mit Leptin behandelten Tiere beider Fütterungsgruppen zeigt, dass die limitiert gefütterten Tiere im Vergleich zu den *ad libitum* gefütterten Tieren im Behandlungszeitraum sogar ca. 20% mehr Futter aufnahmen. Eine statistische Auswertung solcher Vergleiche ist jedoch wegen potenzieller Gruppenunterschiede nicht sinnvoll.

Bei den *ad libitum* gefütterten Tieren war im Vorlauf kein Körpermasseunterschied zwischen Kontroll- und Leptinbehandlungsgruppe erkennbar. Am Ende des Behandlungszeitraumes wurde bei den mit Leptin behandelten Tieren eine signifikante ( $P < 0,05$ ) Reduktion der Körpermasse um 10% im Vergleich zu den Kontrolltieren verzeichnet, deren Körpermasse während des Behandlungszeitraumes eine leicht ansteigende Tendenz zeigte. Im Vergleich zu *ad libitum* gefütterten Tieren zeigte die Gruppe mit limitiertem Futterzugang initial eine um fast 20% niedrigere Körpermasse. Bei Tieren mit limitiertem Futterzugang zeigte sich aber weder vor noch nach der Behandlung ein Unterschied in der Körpermasse der beiden Behandlungsgruppen.

Fazit

Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich zusammenfassend sagen, dass im Rahmen einer 10-tägigen Leptinbehandlung bei Thermoneutralität unter *ad libitum* Fütterung sowohl ein signifikanter Leptineffekt auf das zeitliche Mittel der Futtermenge als auch auf die Körpermasse zu beobachten ist. Beide Effekte treten bei limitiertem Futterzugang nicht auf. Dabei lag die den Tieren mit limitiertem Futterzugang angebotene Futtermenge, die auch vollständig aufgenommen wurde, ca. 20% über der während Leptinbehandlung aufgenommenen Futtermenge von *ad libitum* gefütterten Tieren.

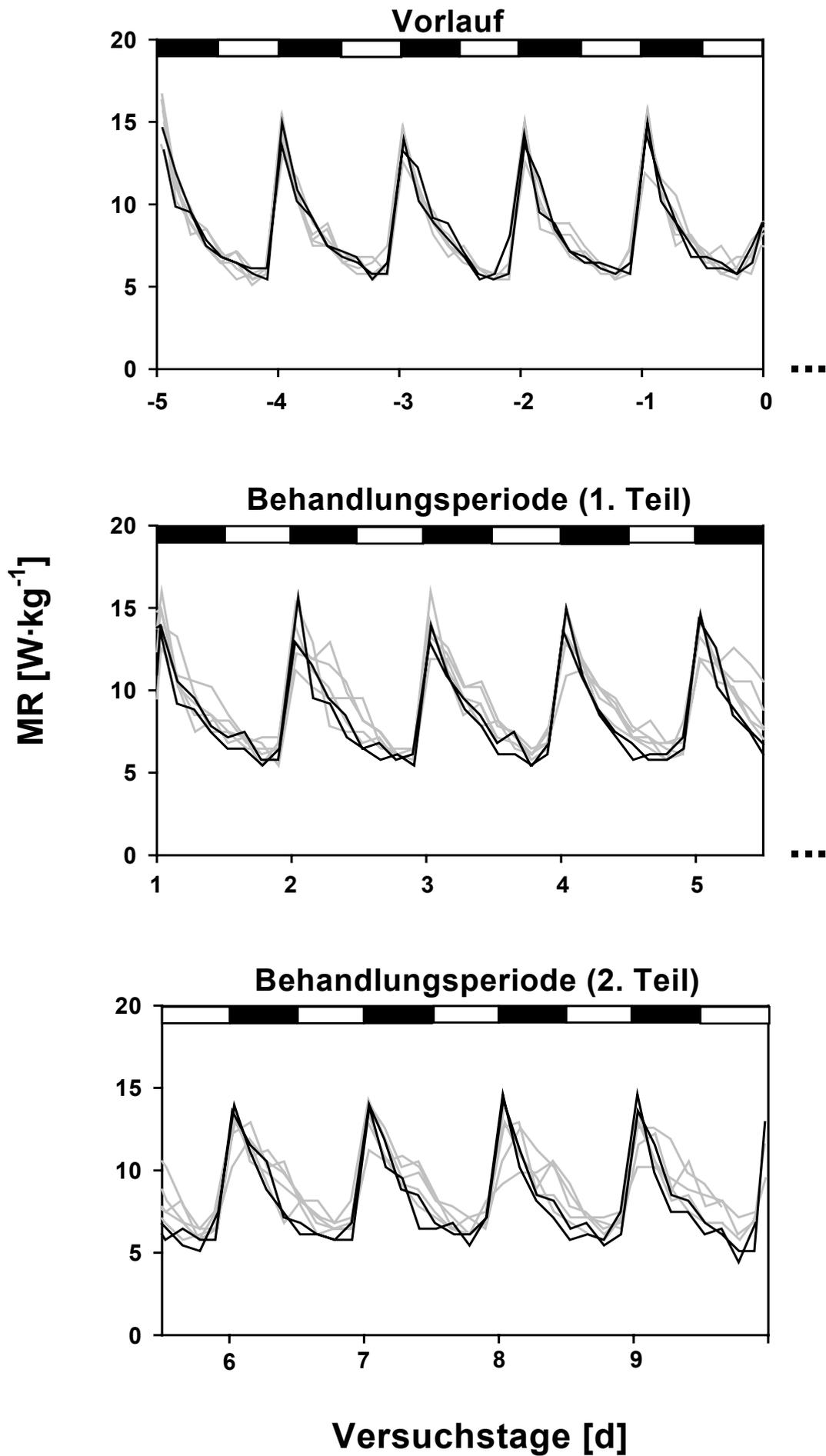


**Abb. 9 (vorhergehende Seite):** Mittelwerte ( $\pm$  SEM) des mittleren täglichen Sauerstoffverbrauches (ADMR) pro Körpermasse-Einheit (oben) und pro Tier (unten) während Vorlauf und Leptinbehandlungsperiode. Mit Leptin behandelte Tiere ( $\bullet$ ), Kontrolltiere ( $\circ$ ). **Links:** Ad libitum Fütterung (Versuchsgruppe C und D, N=14); **rechts:** Limitierter Futterzugang (Versuchsgruppe F, N=7). Die statistische Auswertung erfolgte demgemäß bei ad libitum Fütterung mittels zweifaktorieller ANOVA (mit den Faktoren Behandlung und Versuchsgruppe) und bei limitiertem Futterzugang mittels einfaktorieller ANOVA, so dass sich entsprechend gewichtete und arithmetische Mittelwerte ergeben. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet: \*  $P < 0,05$ , +  $P = 0,06$ .

### 3.2.3 Leptinwirkung auf den Energieverbrauch bei *ad libitum* Fütterung und limitiertem Futterzugang unter thermoneutralen Bedingungen

In gleicher Weise wie das zeitliche Mittel der Futteraufnahme wurden auch die massenspezifische ADMR und die ADMR ausgewertet (Abb. 9). Dabei wurde bei den mit Leptin behandelten Tieren der *ad libitum* Fütterungsgruppe weder im Vorlauf noch während des Behandlungszeitraumes ein Unterschied im zeitlichen Mittel der massenspezifischen ADMR im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt (Abweichung zum Mittelwert der Kontrolltiere  $< 2\%$ ). Das zeitliche Mittel der ADMR lag innerhalb der Leptinbehandlungsgruppe bereits im Vorlauf 2% unter der der Kontrollgruppe. Während des Behandlungszeitraumes vergrößerte sich diese Differenz proportional zur Körpermassenabnahme der behandelten Tiere um weitere 7%, wobei der Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte.

Kontrolltiere mit limitiertem Futterzugang zeigten im Vergleich zu *ad libitum* gefütterten Tieren im zeitlichen Mittel eine ca. 12% geringere massenspezifische ADMR und eine um ca. 30% niedrigere ADMR. Innerhalb der Fütterungsgruppe mit limitiertem Futterzugang kam es bei den mit Leptin behandelten Tieren nach einem ausgeglichenen Vorlauf während der Behandlung zu einem Anstieg des zeitlichen Mittels der massenspezifischen ADMR um 8%, der das Signifikanzniveau knapp verfehlte ( $P = 0,06$ ). Dagegen war der analoge 8%ige Anstieg des zeitlichen Mittels der ADMR signifikant ( $P < 0,05$ ).



**Abb. 10 (vorhergehende Seite):** Verlauf der metabolischen Rate (MR) von 7 Tieren aus Versuchsgruppe F während 5-tägigem Vorlauf (oben) und 10-tägiger Behandlungsperiode (Mitte und unten) mit Ausnahme des ersten Behandlungstages (d 0) basierend auf Mittelwerten über 3 Stunden. **Schwarz:** Kontrolltiere, **grau:** mit Leptin behandelte Tiere. Dunkelphasen entsprechen den Aktivitätsperioden und sind durch schwarze Balken gekennzeichnet.

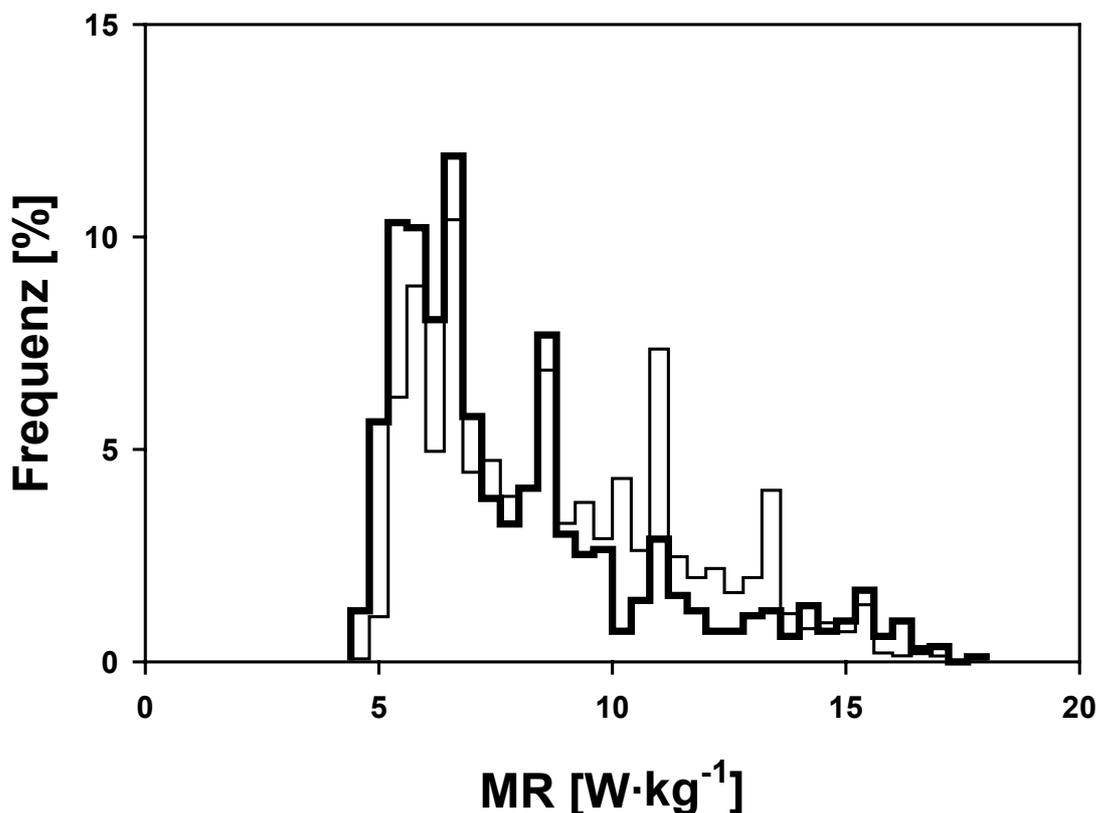
Zur weiteren Analyse der Leptinwirkung auf den Energieverbrauch von Tieren mit limitiertem Futterzugang wurde der circadiane Verlauf der MR auf der Basis von 3-h-Mittelwerten näher untersucht. Bei der Betrachtung des Vorlaufes ergaben sich für die MR Werte in einem Bereich von 5 bis 15 W/kg (Abb. 10 oben). Dabei setzte 2 h vor Beginn der Dunkelphase ein rascher Anstieg der MR ein, die ihr Maximum von ca. 15 W/kg ca. 4 h später, also in den ersten 2 h der Dunkelphase erreichte. Danach fiel die MR innerhalb von 16 h bis zu einem Zeitpunkt von ca. 6 h nach Beginn der Lichtphase auf ca. 5 W/kg ab, woran sich ein Plateau mit minimaler MR über einen Zeitraum von ca. 4 h während der Lichtphase anschloss. Während der 10-tägigen Behandlungsperiode (Abb. 10 Mitte und unten) entsprach das circadiane Maximum der mit Leptin behandelten Tiere in Bezug auf Niveau, Zeitpunkt sowie Zeitraum dem der Kontrolltiere. Im weiteren circadianen Verlauf der MR kam es aber bei den mit Leptin behandelten Tieren zu einem verzögerten Absenken der MR. Auch während des ca. 4-stündigen Minimums der MR lagen die Werte der mit Leptin behandelten Tiere kontinuierlich um ca. 1 W/kg über denen der Kontrolltiere.

Anhand der Häufigkeitsverteilung aller individuellen 3-h-Mittelwerte der MR bei mit Leptin behandelten Tieren im Vorlauf und in der Behandlungsperiode (Abb. 11) wird deutlich, dass im Vorlauf ca. 50% der Werte zwischen 4 und 7 W/kg, ca. 30% zwischen 7 und 10 W/kg und ca. 15% zwischen 10 und 15 W/kg lagen. Nur ca. 5% der Einzelwerte erreichten einen Wert von über 15 W/kg. In der Behandlungsperiode dagegen traten bei den Tieren Werte zwischen 4 und 7 W/kg zu einem deutlich geringerer Prozentsatz (ca. 30%) auf als im Vorlauf. Werte zwischen 7 und 10 W/kg kamen in Vorlauf und Behandlungsphase etwa gleich häufig (ca. 35%) vor, während in der Behandlungsperiode der Anteil der Werte zwischen 10 und 13 W/kg mit ca. 25% deutlich höher lag als während des Vorlaufs. Dagegen ergab sich für den Bereich über 13 W/kg keine Änderung der Häufigkeitsverteilung (ca. 10%) gegenüber dem Vorlauf. Trotz gleicher Amplitude der MR in Vorlauf und Leptin-Behandlungsperiode liegt der prozentuale Anteil der niedrigen Werte der MR somit in der Behandlungsperiode deutlich unter dem des Vorlaufs, während im mittleren

Bereich des Energieumsatzes Werte von mit Leptin behandelten Tieren häufiger vorkommen. Bei Werten im Bereich hoher Stoffwechselraten treten jedoch keine Veränderungen auf.

*Fazit*

Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich zusammenfassend sagen, dass im Rahmen einer 10-tägigen Leptinbehandlung bei einer  $T_a$  am oberen Ende der 24-h-TNZ nur während limitiertem Futterzugang sowohl eine signifikante Erhöhung des zeitlichen Mittels der ADMR zu beobachten ist, als auch der Anstieg der massenspezifischen ADMR in dieser Gruppe nur knapp das Signifikanzniveau verfehlt. Dabei zeigt sich, dass die Erhöhung der MR bei den mit Leptin behandelten Tieren sowohl auf einem gesteigerten Energieumsatz in den Ruheperioden als auch auf einem verzögerten Absinken der MR nach dem Maximum in den Aktivitätsperioden beruht, ohne dass dabei die im Vorlauf maximal erreichten Werte überschritten wurden. Im Gegensatz dazu konnte bei den *ad libitum* gefütterten Tieren zu keiner Zeit ein Anstieg der ADMR sowie der massenspezifischen ADMR beobachtet werden. Das zeitliche Mittel der ADMR der *ad libitum* gefütterten Tiere fiel sogar während der Behandlung unter das ihrer Kontrolltiere.



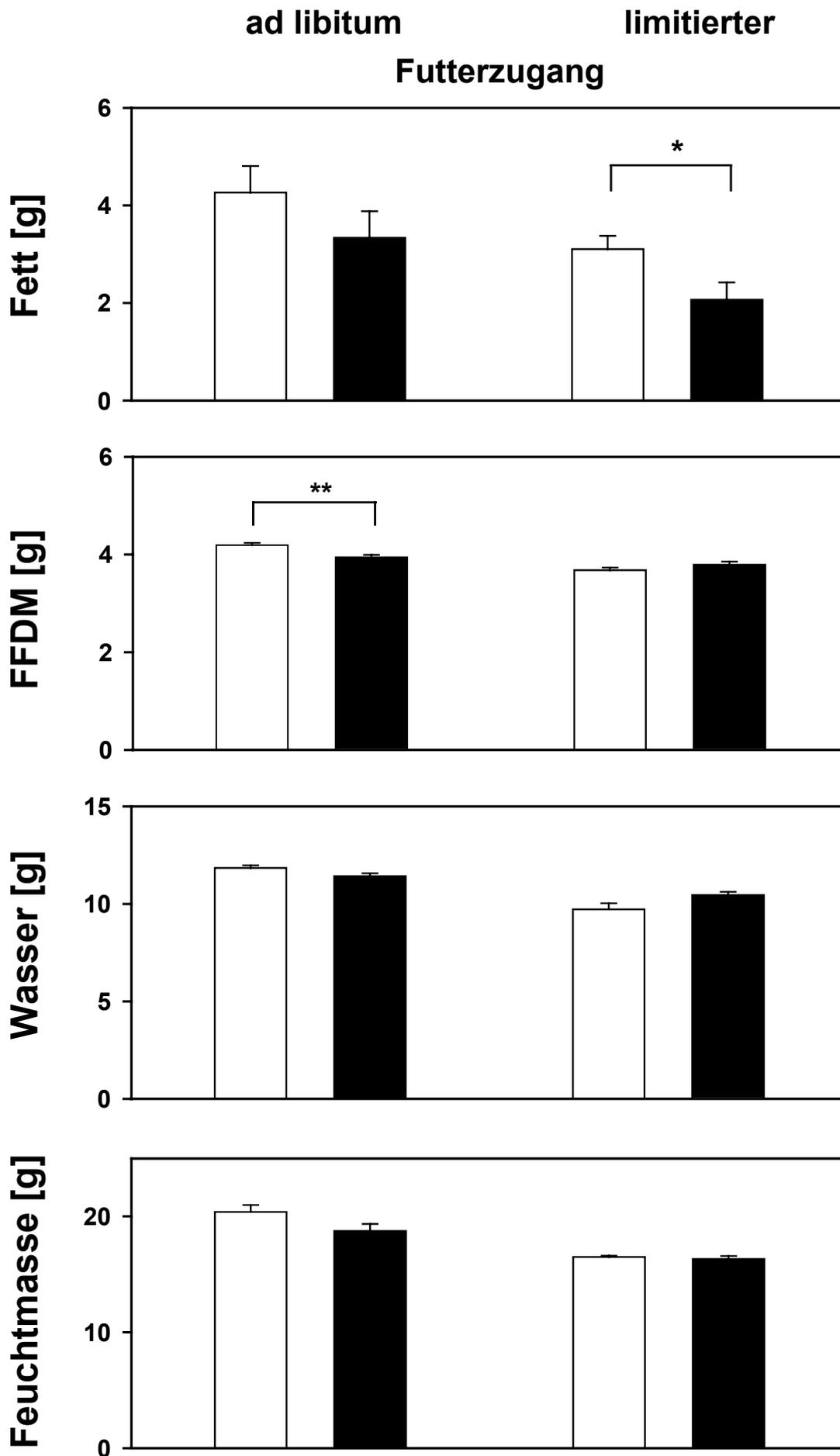
**Abb. 11 (vorhergehende Seite):** Häufigkeitsverteilung aller Meßwerte (2,5 min-Mittel) der massenspezifischen metabolischen Rate (MR) bei mit Leptin behandelten Tieren aus Versuchsgruppe F (N=5). Gezeigt ist die Verteilung auf Intervalle von 0,4 W/kg für alle Meßwerte aus der 5-tägigen Vorlaufperiode (dicke Linie) und der 10-tägigen Behandlungsperiode (dünne Linie).

### 3.2.4 Leptinwirkung auf die Körperzusammensetzung bei *ad libitum* Fütterung und limitiertem Futterzugang unter thermoneutralen Bedingungen

Obwohl sich bei der zweifaktoriellen ANOVA mit den Faktoren Behandlung und Versuchsgruppe bei der mit Leptin behandelten Gruppe gegenüber der *ad libitum* gefütterten Tiere nach Behandlungsende eine um ca. 20% niedrigere Körperfettmasse im Vergleich zu ihren Kontrolltieren ergab, verfehlte dieser Unterschied aufgrund der großen Streuung der Einzelwerte das Signifikanzniveau (Abb. 12). Die Fettmasse der Kontrolltiere mit limitiertem Futterzugang lag ca. 30% unter dem Wert der *ad libitum* gefütterten Kontrolltiere. Die Körperfettmasse der mit Leptin behandelten Tiere mit limitiertem Futterzugang war im Vergleich zu ihren Kontrolltieren um ca. 35% niedriger ( $P < 0,05$ ). Trotz des annähernd gleichen Unterschiedes der mittleren Fettmasse von ca. 1 g zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe innerhalb beider Fütterungsgruppen, zeigten Tiere mit limitiertem Futterzugang aufgrund ihrer geringeren Ausgangsfettmasse somit einen stärkeren prozentualen Leptineffekt auf die Fettmasse als Tiere mit *ad libitum* Fütterung.

Der Körperfettgehalt (nicht gezeigt), der als Maß für die Adiposität dient, betrug innerhalb der *ad libitum* Fütterungsgruppe bei den mit Leptin behandelten Tieren am Versuchsende ca. 17% während der ihrer Kontrolltiere bei ca. 21% lag. Mit Leptin behandelte limitiert gefütterte Tiere hatten mit ca. 13% einen signifikant ( $P < 0,05$ ) niedrigeren Körperfettgehalt als ihre Kontrolltiere mit ca. 19%.

Die FFDM der mit Leptin behandelten *ad libitum* gefütterten Tiere war ca. 6% niedriger als die ihrer Kontrolltiere ( $P < 0,01$ ). Die Kontrolltiere der Fütterungsgruppe mit limitiertem Futterzugang besaßen im Vergleich zu den *ad libitum* gefütterten Kontrolltieren eine um ca. 10% niedrigere FFDM. Die mit Leptin behandelten Tieren mit limitiertem Futterzugang zeigten eine geringfügig höhere FFDM von 3% im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe.



**Abb. 12 (vorhergehende Seite):** Mittelwerte ( $\pm$  SEM) für Körperfettmasse, fettfreie Trockenmasse (FFDM), Körperwasser und Feuchtmasse am Ende der 10-tägigen Leptinbehandlungsperiode. Mit Leptin behandelte Tiere (●), Kontrolltiere (○). **Links:** Ad libitum Fütterung (Versuchsgruppe C und D, N=14); **rechts:** Limitierter Futterzugang (Versuchsgruppe F, N=7). Die statistische Auswertung erfolgte demgemäß bei ad libitum Fütterung mittels zweifaktorieller ANOVA (mit den Faktoren Behandlung und Versuchsgruppe) und bei limitiertem Futterzugang mittels einfaktorieller ANOVA, so dass sich entsprechend gewichtete und arithmetische Mittelwerte ergaben. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

Bei den *ad libitum* gefütterten Tieren lag die Körperwassermasse der Leptinbehandlungsgruppe ca. 5% unter der der Kontrollgruppe. Kontrolltiere mit limitiertem Futterzugang besaßen ca. 20% weniger Körperwasser als die *ad libitum* gefütterten Kontrolltiere. Das Körperwasser der mit Leptin behandelten Gruppe mit limitiertem Futterzugang war ca. 10% höher als das ihrer Kontrollgruppe. In Bezug auf ihre Feuchtmasse (s.u.) zeigen die mit Leptin behandelten Tiere beider Fütterungsgruppen im Vergleich zu ihren Kontrolltieren eine Erhöhung des Körperwassers um ca. 5%. Da in Langzeitstudien der Energieumsatz häufig auf die „lean body mass“, die sich aus FFDM und Körperwasser zusammensetzt, bezogen wird, bleibt zu berücksichtigen, dass diese sich zwischen den Kontrolltieren beider Fütterungsgruppen um ca. 20% unterscheidet. Dabei beruht dieser Unterschied gleichermaßen auf der Differenz in der FFDM und im Körperwasser der beiden Fütterungsgruppen.

Die Feuchtmasse, die im Gegensatz zur (Lebend-)Körpermasse Unterschiede im Füllungs-zustand des Magen-Darm-Traktes ausschließt, ansonsten aber Unterschiede in FFDM, Fett- und Wassermasse in ihrer Kombination zeigt, war bei den mit Leptin behandelten Tieren der *ad libitum* gefütterten Gruppe um ca. 10% geringer als bei ihren Kontrolltieren, dieser Unterschied erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau. Kontrolltiere mit limitiertem Futterzugang besaßen in Übereinstimmung mit ihrer geringeren Körpermasse eine um ca. 20% niedrigere Feuchtmasse als die *ad libitum* gefütterten Kontrolltiere, während bei den mit Leptin behandelten Tieren mit limitiertem Futterzugang analog zur Körpermasse kein Unterschied zu ihren Kontrolltieren vorhanden war.

### Fazit

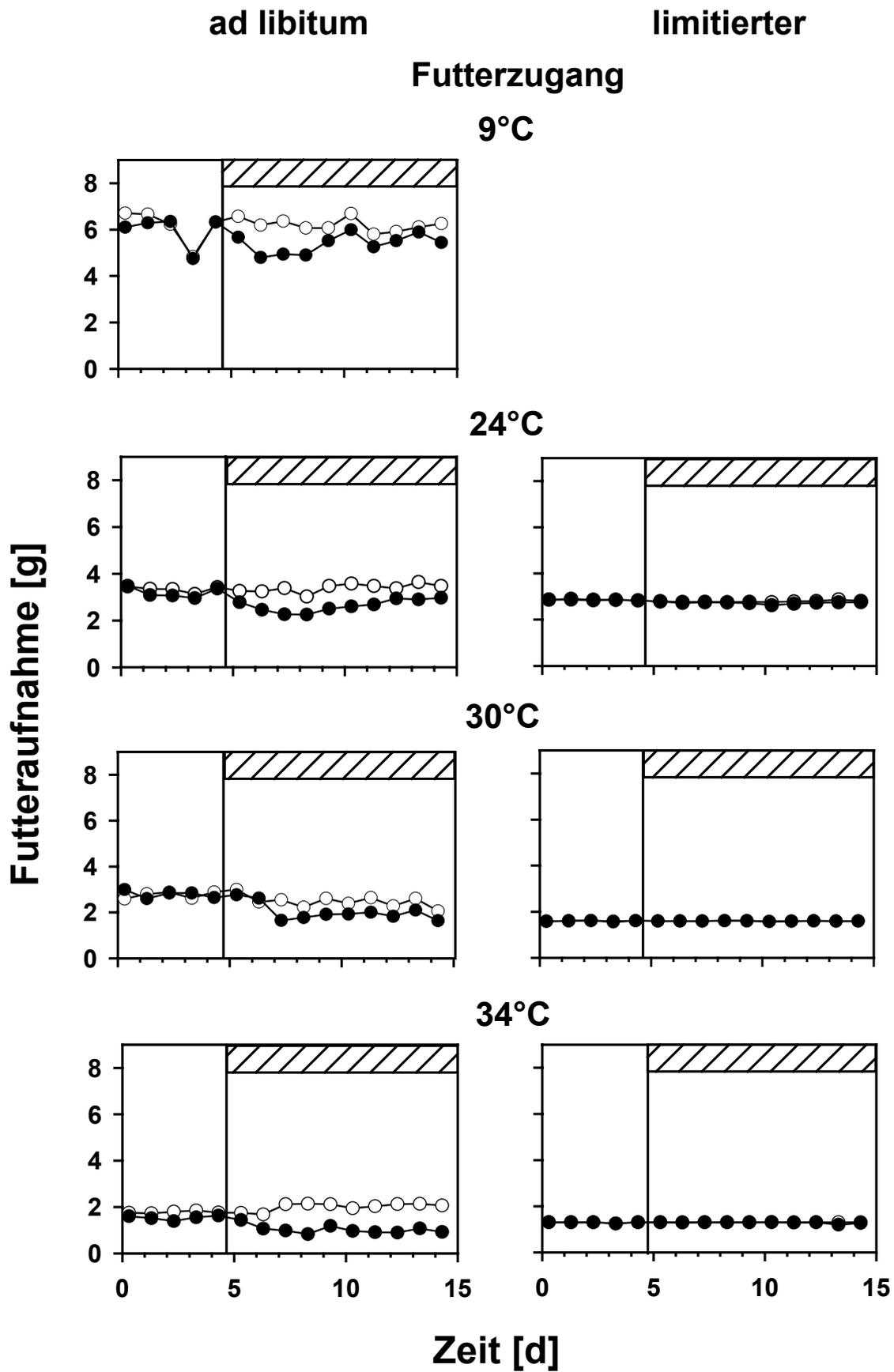
Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich zusammenfassend sagen, dass bei Thermo-neutralität sowohl *ad libitum* gefütterte Tiere als auch Tiere mit limitiertem Futterzugang in Folge einer 10-tägigen Leptinbehandlung einen im Vergleich zu den jeweiligen

Kontrolltieren niedrigeren Körperfettgehalt aufweisen. Obwohl die Tiere mit limitiertem Futterzugang bereits initial einen niedrigeren Körperfettgehalt als die der *ad libitum* gefütterten Gruppe haben und während einer Leptinbehandlung ausschließlich ihre MR erhöhen, statt ihre Futteraufnahme zu reduzieren wie die *ad libitum* gefütterten Tiere, liegt die Körperfettmasse von mit Leptin behandelten Tieren in beiden Fütterungsgruppen energetisch gleichwertig um 1 g unter derjenigen der jeweiligen Kontrolltiere. Allerdings ist die beobachtete Steigerung der MR bei den Tieren mit limitiertem Futterzugang energetisch nicht ausreichend, um die festgestellte Differenz in der Körperzusammensetzung zur Kontrollgruppe zu erklären. Es ist also anzunehmen, dass spontane Schwankungen in der Körperzusammensetzung aufgrund der, nach Ausschluss von Versuchsgruppe E aus der quantitativen Auswertung, geringen N-Zahl auftreten, die dazu führen, dass zwar die Richtung der Änderungen aufgezeigt wird, aber eine exakte quantitative Bestimmung der Energiebilanz noch nicht möglich ist.

### **3.2.5 Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Leptinwirkung bei *ad libitum* und limitierter Fütterung von Standardfutter**

#### **3.2.5.1 Temperaturabhängige Modifikation der Leptinwirkung auf die Futteraufnahme**

Um den Einfluss der  $T_a$  auf das zeitliche Mittel der Futteraufnahme, sowie auf den Leptineffekt bei *ad libitum* und limitiert gefütterten Tieren zu untersuchen, wurden die Daten 10-tägiger Leptinbehandlungen bei 9, 24, 30 und 34°C (Daten ergänzt durch Döring 2000 und I. Schmidt, unveröffentlichte Daten) miteinander verglichen (Abb. 13). Innerhalb der *ad libitum* Fütterungsgruppe war bei den Kontrolltieren mit ansteigender  $T_a$  ein signifikant niedrigeres ( $P < 0,001$ , einfaktorielle ANOVA) zeitliches Mittel der Futteraufnahme zu beobachten. Dieses sank im Mittel von ca. 6,0 g/d bei 9°C auf ca. 2,0 g/d bei 34°C (siehe Abb. 14 links unten). Die Futteraufnahme der mit Leptin behandelten Tiere erniedrigte sich in gleichem Maße, so dass sie grundsätzlich ohne systematische Veränderung mit der  $T_a$  im Mittel um 0,5 bis 0,9 g unter den jeweiligen Kontrollmitteln lag. Nur wenn diese Werte in Prozent der jeweils von den Kontrolltieren aufgenommenen Futtermenge ausgewertet wurden (nicht gezeigt), kam es zu einer signifikanten ( $P < 0,001$ ) systematischen Veränderung mit der  $T_a$ , wobei die Reduzierung des zeitlichen Mittels der Futteraufnahme bei den mit Leptin behandelten Tieren von ca. 10% bei 9°C bis zu ca. 50% bei 34°C reichte.



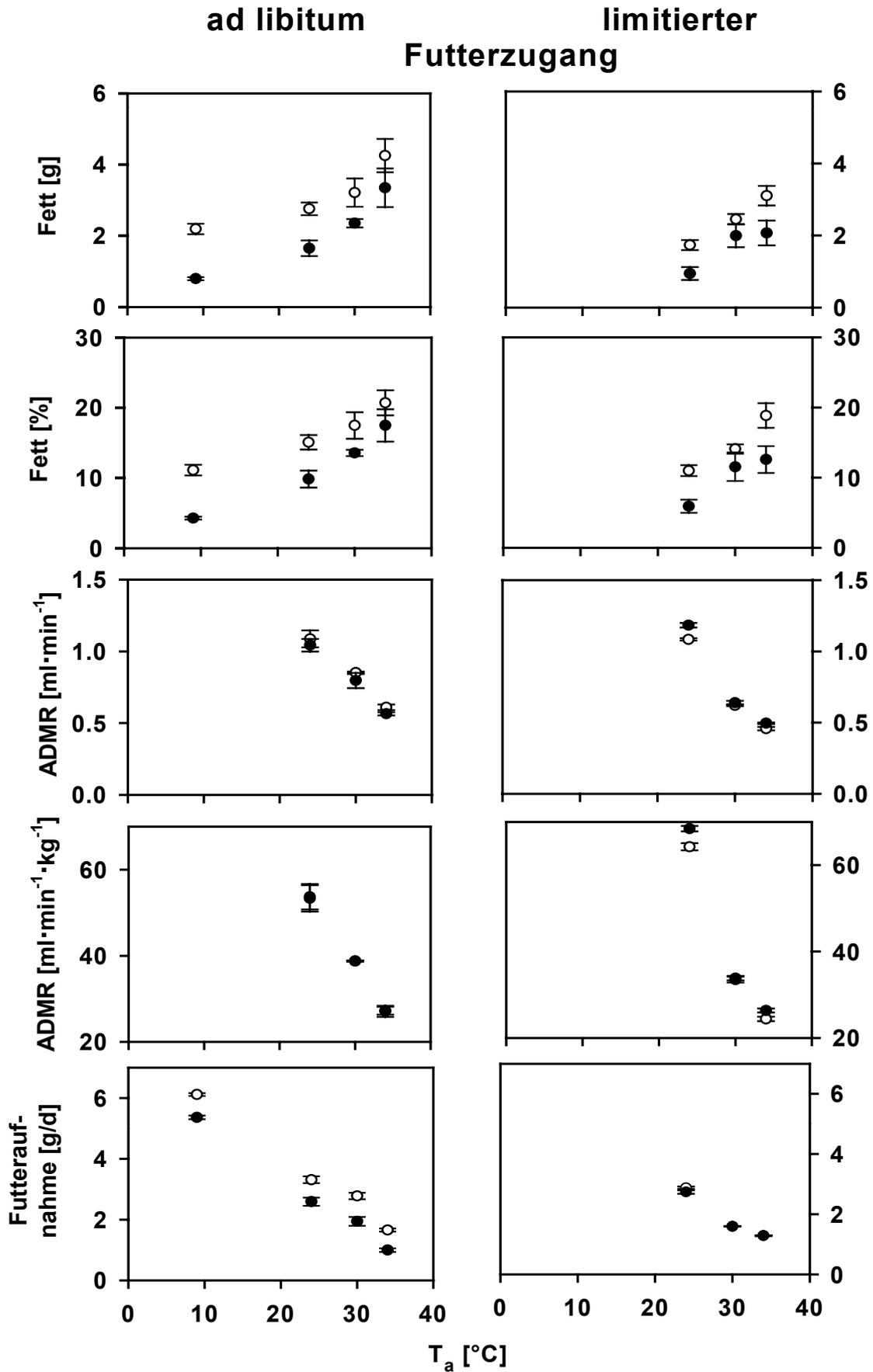
**Abb. 13 (vorhergehende Seite):** Futteraufnahme bei verschiedenen Umgebungstemperaturen. Gezeigt sind die Mittelwerte für mit Leptin behandelte (●) und Kontrolltiere (○) während des Vorlaufs und der Leptinbehandlungsperiode (Balken) von jeweils 1-3 Versuchsgruppen mit *ad libitum* (links) und limitiertem Futterzugang (rechts). Auf die Darstellung des Standardfehlers wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. Abbildungen bei 9, 24 und 30°C basieren auf Auswertungen der Daten von Döring 2000 und unveröffentlichten Daten von I. Schmidt.

Bei Tieren mit limitiertem Futterzugang konnte mit ansteigender  $T_a$  die verabreichte Futtermenge signifikant ( $P < 0,001$ ) von ca. 3 g/d bei 24°C auf ca. 1,3 g/d bei 34°C gesenkt werden (siehe Abb. 14 rechts unten), ohne eine kritische Körpermasse zu unterschreiten. Dabei wurde die angebotene Futtermenge von den Kontrollgruppen jeweils restlos aufgenommen. Die bereits oben erläuterte Problematik der Wahl einer geeigneten limitierten Futtermenge zeigt sich darin, dass die limitiert gefütterten Kontrolltiere im Vergleich zu den *ad libitum* gefütterten Kontrolltieren bei gleicher  $T_a$  bei 24°C ca. 10%, bei 30°C ca. 40% und bei 34°C ca. 20% weniger Futter aufnahmen. Bei keiner der getesteten  $T_a$  kam es innerhalb der limitiert gefütterten Gruppe bei den mit Leptin behandelten Tieren zu einer signifikanten Reduktion des zeitlichen Mittels. Die größte Reduktion (-0,06 g) trat ab dem 4. Injektionstag bei 24°C auf, der  $T_a$ , bei der die geringste prozentuale Futterreduktion verwendet wurde. Aber selbst dieser Effekt beruhte nur auf einer tageweise verminderten Futteraufnahme von 3 der insgesamt 12 mit Leptin behandelten Einzeltiere.

### 3.2.5.2 Temperaturabhängige Modifikation der Leptinwirkung auf die Körperfettmasse und den Körperfettgehalt

Weiterführend erfolgte bei den gleichen Tieren eine Untersuchung der leptininduzierten Beeinflussung der Körperfettmasse und des Körperfettgehalts in Abhängigkeit von der  $T_a$ . Innerhalb der Kontrollgruppe der *ad libitum* gefütterten Tiere ergaben sich dabei sowohl in der Körperfettmasse als auch in dem die Adiposität widerspiegelnden Körperfettgehalt mit ansteigender  $T_a$  bei annähernd exponentiellem Verlauf signifikant ( $P < 0,01$ , einfaktorielle ANOVA) höhere Werte (Abb. 14 links oben). So verdoppelten sich zwischen 9 und 34°C gleichermaßen der Körperfettgehalt von ca. 10% auf 20% und die Körperfettmasse von 2,2 auf 4,3 g. Die Körperfettmasse und der Körperfettgehalt der mit Leptin behandelten Tiere befanden sich bei allen  $T_a$  unterhalb ihres zugehörigen Kontrollmittels, wobei sich die Differenz in der Körperfettmasse zwischen beiden Behandlungsgruppen mit ansteigender

T<sub>a</sub> geringfügig von ca. 1,5 g bei 9 auf ca. 1 g bei 24, 30 und 34°C reduzierte. Entsprechend veränderte sich der Körperfettgehalt.



**Abb. 14 (vorhergehende Seite):** Abhängigkeit der Körperfettmasse, des prozentualen Körperfettgehaltes, des mittleren täglichen Sauerstoffverbrauches (ADMR) pro Tier sowie pro Körpermasse-Einheit und der mittleren Aufnahme von Standardfutter bei *ad libitum* Fütterung (links) und limitierter Futterzugang (rechts) von der Umgebungstemperatur ( $T_a$ ). Gezeigt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SE) für mit Leptin behandelte (●) und Kontrolltiere (○) aus jeweils 1-3 Versuchsgruppen. Die Werte bei 9, 24 und 30°C basieren auf Auswertungen der Daten von Döring 2000 und unveröffentlichten Daten von I. Schmidt.

Auch Tiere mit limitiertem Futterzugang wiesen mit ansteigender  $T_a$  einen signifikanten ( $P < 0,001$ ) Anstieg der Körperfettmasse sowie des Körperfettgehaltes auf (Abb. 14 rechts oben). Dabei verringerte sich die Differenz im Körperfettgehalt zwischen den *ad libitum* und den limitiert gefütterten Kontrollgruppen mit ansteigender  $T_a$  von 15% vs. 11% bei 24°C auf 21% vs. 19% bei 34°C, während die Unterschiede in der Körperfettmasse sich dagegen nicht systematisch veränderten und generell zwischen ca. 0,8 und 1,2 g lagen. Die Körperfettmasse der mit Leptin behandelten Tiere lag bei den limitiert gefütterten Gruppen im Mittel um 0,6 bis 1,0 g unter den jeweiligen Kontrollmitteln ohne systematische Veränderung mit der  $T_a$  in einem Bereich zwischen 24 und 34°C, der Körperfettgehalt verhielt sich analog zur Körperfettmasse.

### 3.2.5.3 Temperaturabhängige Modifikation der Leptinwirkung auf die ADMR

Bei der Untersuchung der leptininduzierten Beeinflussung der ADMR sowie der massenspezifischen ADMR in Abhängigkeit von der  $T_a$  zeigte sich bei der *ad libitum* Fütterungsgruppe (Abb. 14 links), für die bei 9°C keine Sauerstoffmessung erfolgt war, mit ansteigender  $T_a$  eine annähernd linear verlaufende, signifikante Reduktion beider Parameter bei den Kontrolltieren ( $P < 0,001$ , einfaktorielle ANOVA). Dabei wurden im Mittel Werte von ca. 1,1 ml·min<sup>-1</sup> O<sub>2</sub> bzw. ca. 53 ml·min<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup> O<sub>2</sub> bei 24°C erreicht, die bis auf ca. 0,6 ml·min<sup>-1</sup> bzw. ca. 27 ml·min<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup> bei 34°C absanken. Die ADMR der mit Leptin behandelten Tiere lag analog zu der reduzierten Futteraufnahme bei allen  $T_a$  ca. 0,1 ml·min<sup>-1</sup> unterhalb ihres zugehörigen Kontrollmittels, während bei der massenspezifischen ADMR keine Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen auftraten.

Auch Kontrolltiere mit limitiertem Futterzugang zeigten mit ansteigender  $T_a$  eine signifikante ( $P < 0,001$ ) Reduzierung der ADMR sowie der massenspezifischen ADMR (Abb. 14 rechts). Bei der Auswertung der Ergebnisse muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Anzahl der Tiere, deren ADMR innerhalb einer Versuchsgruppe bestimmt werden

kann, auf 7 limitiert ist (siehe 2.6.2) und sich die Befunde bei 30 und 34°C nur auf eine Gruppe stützen. Mit Ausnahme der bei 24°C bestimmten Werte, die von Tieren stammen, bei denen die mittlere Körpermasse den kritischen Wert von 17 g erreichte, war bei den Tieren mit limitiertem Futterzugang die ADMR im Mittel um ca. 10% und die massenspezifische ADMR um ca. 25% niedriger als die der *ad libitum* gefütterten Tiere. Bei den mit Leptin behandelten Tieren waren innerhalb der limitiert gefütterten Gruppe sowohl die ADMR als auch die massenspezifische ADMR im Vergleich zum Mittelwert ihrer Kontrolltiere ohne erkennbare  $T_a$ -Abhängigkeit 1-8% bzw. 3-9% erhöht.

### *Fazit*

Wird bei *ad libitum* gefütterten Tieren die für den Leptineffekt energetisch relevante Änderung der Energieaufnahme als Maß verwendet, ergibt sich kein Hinweis auf eine Abnahme der Leptinresponsivität mit ansteigender  $T_a$ . Bei der Darstellung der Energieaufnahme in Prozent der von den Kontrolltieren aufgenommenen Futtermenge würde sich sogar eine systematische Steigerung des Leptineffekts mit ansteigender  $T_a$  ergeben. Somit weisen die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass die Ursache eines mit ansteigender  $T_a$  geringfügig reduzierten Leptineffektes auf die Körperfettmasse und den Körperfettgehalt nicht in einer mangelnden Senkung der Energieaufnahme liegt. Eine temperaturabhängige Modifikation des Leptineffektes auf die Körperfettreserven ohne eine nachweisbare Temperaturabhängigkeit der Leptinwirkung sowohl auf die Futterraufnahme als auch auf den Energieverbrauch könnte möglicherweise auf eine Verringerung der Resorption von Nährstoffen mit ansteigender  $T_a$  zurückzuführen sein. Falls die tatsächlich verwertbare Energie pro Gramm aufgenommenes Futter mit ansteigender  $T_a$  sinkt, wäre so bei gleicher leptininduzierter Änderung der Futterraufnahme eine schwächere Leptinwirkung bei höheren  $T_a$  zu erklären. Zur Ergänzung der vorliegenden Befunde wäre also sowohl die Erhöhung der N-Zahl als auch die Erstellung einer Energiebilanz sinnvoll, die auch die mit Faeces und Urin ausgeschiedene Energie mit berücksichtigt.

Bei der Gruppe mit limitiertem Futterzugang, bei der die Erhöhung des Energieverbrauches den energetisch relevanten Leptineffekt darstellt, kommt es zu keiner systematischen Änderung des Leptineffektes auf den Körperfettgehalt mit der  $T_a$ . Da die Anzahl der untersuchten Tiere aber bisher gering ist, ist diese Feststellung noch mit Unsicherheit behaftet.

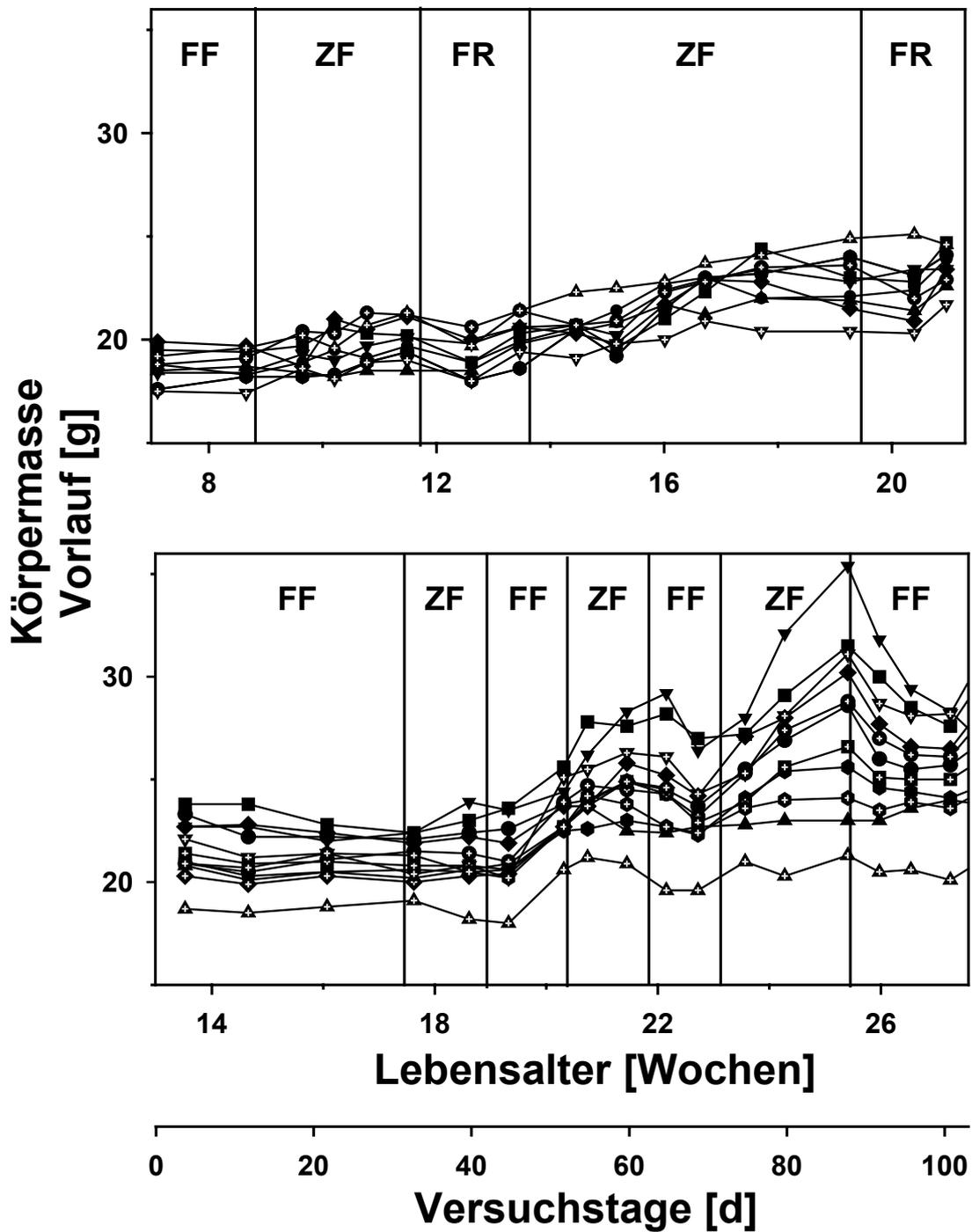
### **3.3 VERSUCHSREIHE IV**

#### **ZYKLISCHE FÜTTERUNG VON SENSORISCH ATTRAKTIVEM, HOCHKALORISCHEN ZUSATZFUTTER**

Zur Untersuchung der Leptinresponsivität in Abhängigkeit vom Nahrungsangebot wurden in regelmäßigen Abständen eintägige Leptininjektionen bei Mäusen durchgeführt, denen in zyklischen Abständen von ca. 15 Tagen hochkalorisches Zusatzfutter plus Standardfutter oder ausschließlich Standardfutter angeboten wurde. Da eine eintägige Leptinbehandlung im Gegensatz zu der bereits erwähnten 10-tägigen Langzeitbehandlung (vgl. 3.2) nur einen kaum messbaren Einfluss auf die Körperfettspeicher hat, wurde hier die Reduktion der Gesamtenergieaufnahme als Maß für die Leptinresponsivität herangezogen. Für die Auswertung wurde der Tag nach der Leptinverabreichung herangezogen, da sich in vorhergehenden Untersuchungen bereits gezeigt hatte, dass sich die Wirkung einer eintägigen Leptinbehandlung mit der hier verwendeten Dosis ausschließlich auf diesen Zeitraum beschränkt (Döring 2000).

##### **3.3.1 Beeinflussung der Körpermasse bei periodischem Angebot eines sensorisch attraktiven Zusatzfutters**

Erhalten adulte C57Bl/6J-Mäuse im periodischen Wechsel ausschließlich Standardfutter oder additiv dazu ein sensorisch attraktives, hochkalorisches, fett- und kohlenhydratreiches Zusatzfutter, kommt es, wie in Abb. 15 exemplarisch anhand der Versuchsgruppen G (oben, Alter 7 Wochen) und H (unten, Alter 13 Wochen) dargestellt, zu deutlichen Veränderungen der Körpermasse. Die gezeigten Werte entsprechen den individuellen Mittelwerten der Körpermasse über den jeweils zweitägigen Vorlauf der verschiedenen Leptinbehandlungen, die in regelmäßigen Abständen im Versuchsverlauf durchgeführt wurden. Innerhalb von Versuchsgruppe H wurden zu Versuchsbeginn 3 Körpermassewerte in dem Zeitraum mit Fütterung von Standardfutter gezeigt, obwohl in diesem Zeitraum keine Leptinbehandlungen durchgeführt wurden. Dabei entsprach der Abstand zwischen zwei ermittelten Körpermasse-Werten in etwa dem Zeitraum, der üblicherweise zwischen zwei durchgeführten Leptinbehandlungen lag.

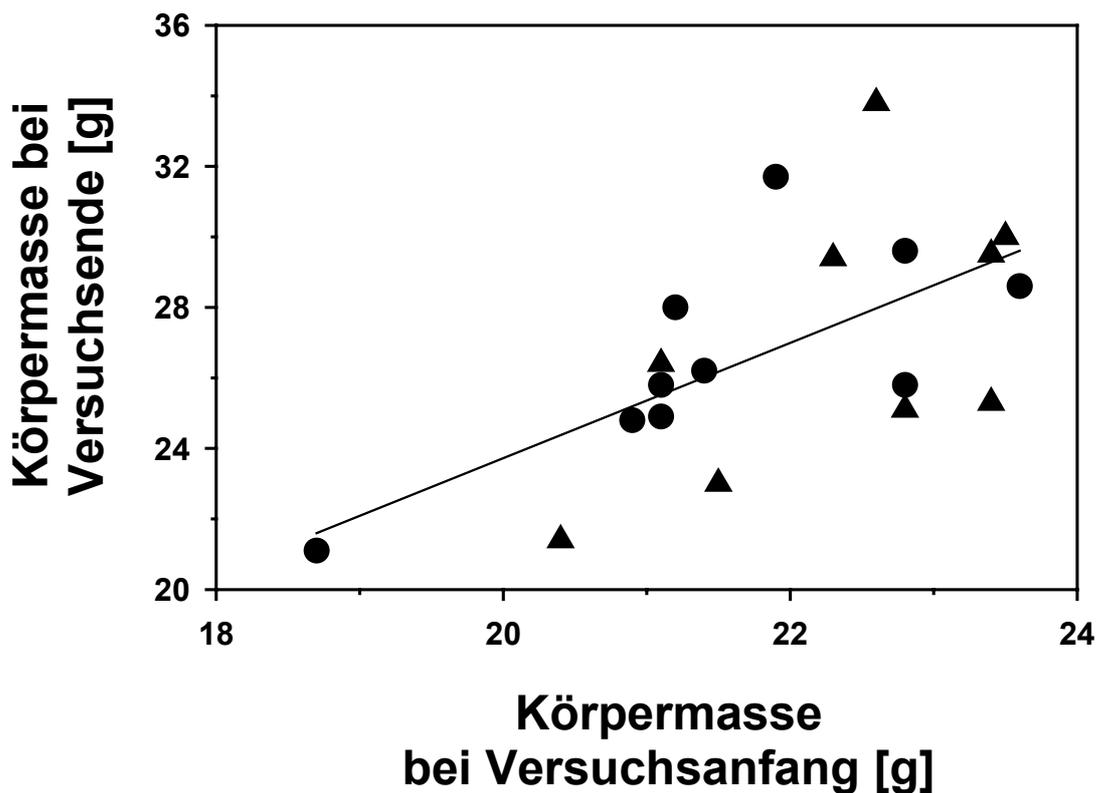


*Abb.15: Körpermasseverlauf bei Versuchsgruppe G (oben, N=10) und H (unten, N=12). Dargestellt sind ausschließlich von den Leptinininjektionen unbeeinflusste Werte. Einzeltiere sind durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet. FF: Standardfutter ad libitum; FR: limitierter Zugang zu Standardfutter; ZF: Standardfutter plus Zusatzfutter ad libitum. Senkrechte Linien markieren einen Futterwechsel.*

Die vorliegende Studie belegt, dass Perioden mit Zugang zu Zusatzfutter generell zu einem Körpermassenanstieg führen, dem grundsätzlich eine Abnahme nach Entzug des Zusatzfutters folgt. In einer parallel angefertigten Diplomarbeit<sup>4</sup> wurde ermittelt, dass die Tiere in solchen Perioden mit alleinigem Zugang zu Standardfutter jedoch durchschnittlich nur  $65\pm 9\%$  des zuvor in der gleichen Zeit erzielten Körpermassenzuwachses verlieren. Somit erfolgt die Reduktion der Körpermasse nach Entzug der Zusatzdiät langsamer als die vorherige Zunahme, d.h. der Anstieg der Körpermasse verläuft steiler als der Abfall. Übereinstimmend mit diesem Befund führte der periodische Wechsel des Nahrungsangebotes bei der hier gewählten Periodendauer von 6-23 Tagen trotz einer Abnahme in den Perioden mit ausschließlicher Fütterung von Standardfutter somit insgesamt zu einem kontinuierlichen Körpermassenzuwachs. Dabei ergaben sich im Verlauf der Körpermasse innerhalb einer Versuchsgruppe deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren, wobei vor allem ein Tier aus Versuchsgruppe H auffiel, das trotz einer vom Mittel nicht abweichenden Gesamtenergieaufnahme während des gesamten Versuchszeitraumes von ca. 100 Tagen (nicht dargestellt) nur eine sehr geringe Körpermassenzunahme von 1,4 g zeigt. Aufgrund dieses unterschiedlichen Körpermassenzuwachses der Einzeltiere erhöht sich mit steigender Anzahl der hochkalorischen Perioden innerhalb der Körpermasse auch die Streuung der Einzeltiere kontinuierlich von  $\pm 2,5$  g zu Versuchsbeginn auf bis  $\pm 5,5$  g zu Versuchsende. Obwohl der periodische Wechsel des Nahrungsangebotes bei den Tieren aus Versuchsgruppe G und H zu deutlichen Änderungen in der Körpermasse führt, zeigt sich in Abb. 16 eine positive Korrelation ( $r = 0,62$ ,  $P < 0,01$ ) zwischen der Körpermasse vor erstmaligem Angebot einer energiereichen Zusatznahrung bei Versuchsbeginn im Alter von 17 (Versuchsgruppe G) bzw. 13 Wochen (Versuchsgruppe H) und der nach Durchlaufen mehrerer Futterperioden bei Versuchsende im Alter von 23 bzw. 43 Wochen ( $P < 0,01$ ).

---

<sup>4</sup> Quelle: Diplomarbeit C. Daniel, Fachbereich Haushalts- und Ernährungswissenschaften, Universität Gießen, 2002



**Abb. 16:** Korrelation zwischen der über 8 Tage gemittelten Körpermasse am Versuchsende (Alter 28 bzw. 43 Wochen) und am Versuchsanfang (Alter 17 bzw. 13 Wochen) bei Versuchsgruppe G (▲) und H (●). ( $y = 1,63 x - 8,97$ ,  $r = 0,62$ ,  $P < 0,01$ ).

#### Fazit

Die vorliegenden Befunde belegen, dass ein periodischer Zugang zu Zusatzfutter insgesamt zu einem kontinuierlichen Zuwachs der Körpermasse führt, der über das Maß der üblichen altersbedingten Zunahme während ausschließlichem Zugang zu Standardfutter hinausgeht<sup>5</sup>. Obwohl sich mit steigender Körpermasse auch die Streuung der Einzeltierwerte erhöht, ergibt sich eine positive Korrelation zwischen End- und Ausgangskörpermasse vor erstmaligem Zugang zu Zusatzfutter, die sich bei Tieren, die ausschließlich Standardfutter erhalten, nicht nachweisen läßt<sup>5</sup>. Die Ausgangskörpermasse bei Standardfütterung scheint also ein Prädiktor für die Empfindlichkeit zur späteren Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas zu sein.

<sup>5</sup> Quelle: Diplomarbeit C. Schubert, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg, 2002

### 3.3.2 Beeinflussung der Leptinresponsivität bei periodischem Angebot eines sensorisch attraktiven Zusatzfutters<sup>6</sup>

#### 3.3.2.1 Fütterungsbedingte Modifikation der Leptinwirkung auf die Futteraufnahme

Als Beurteilungskriterium für die Abhängigkeit der Leptinresponsivität von den Faktoren „Zeitmuster der Zusatzfütterung“, „Zeitraum zwischen Futterwechsel und Leptinbehandlung“ und „Gesamtdauer der Zusatzfütterung“ wurde exemplarisch bei Versuchsgruppe G und H die Modifikation der Reaktionen auf eine Leptin-Dosis von  $200 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  am jeweils 3., 6. bzw. 7., 11. und 15. Tag nach Futterwechsel untersucht (Abb. 17). Zur systematischen Auswertung der Befunde wurden die Werte von Tieren, die zum ersten Mal Zugang zu Zusatzfutter hatten, und Tieren, die sich nach Zusatzfütterung von mindestens 30 Tagen erneut in einer Periode mit Zugang zu Zusatzfutter befanden, miteinander verglichen (Abb. 18). Da die eigens erhobenen Daten für eine statistische Analyse nicht ausreichten, wurden zur Steigerung der N-Zahl zusätzlich Daten aus einer parallel laufenden Diplomarbeit<sup>5</sup> herangezogen (siehe 2.5.5 Tabelle 2).

Zunächst wurde als Referenzwert für die Reaktionsstärke „naiver“ Tiere (d.h. von Tieren, die noch nie mit energiereicher Nahrung konfrontiert worden waren) im Alter von mindestens 10 Wochen auf eine eintägige Leptinbehandlung der Dosis von  $200 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  bestimmt. Dabei ergab sich im Mittel für alle naiven Tiere eine signifikante Differenz in der Gesamtenergieaufnahme zwischen der Leptinbehandlungsgruppe und dem Mittel der Kontrolltiere von -12 kJ (Abb. 18 oben, 1. Balken). Beim erstmaligem Angebot eines Zusatzfutters kam es nach 3 und 7 Tagen zu einer bereits 50% niedrigeren, aber noch signifikanten Leptin-Wirkung. Nach 11 und 15 Tagen erreichte die Veränderung der Energieaufnahme das Signifikanzniveau nicht mehr. Ein darauf folgender Entzug des Zusatzfutters führte bereits nach 3 Tagen wieder zu einer signifikanten Leptinwirkung auf die Energieaufnahme und die gleiche Reaktionsstärke wie bei naiven Tieren wurde nach 7 Tagen errechnet. Somit zeigt sich bei erstmaligem Angebot eines Zusatzfutters sowohl eine langsame Abnahme des Leptineffektes infolge der Zusatzfütterung als auch eine rasche Wiederherstellung der Leptinresponsivität bei Rückkehr zu Standardfutter.

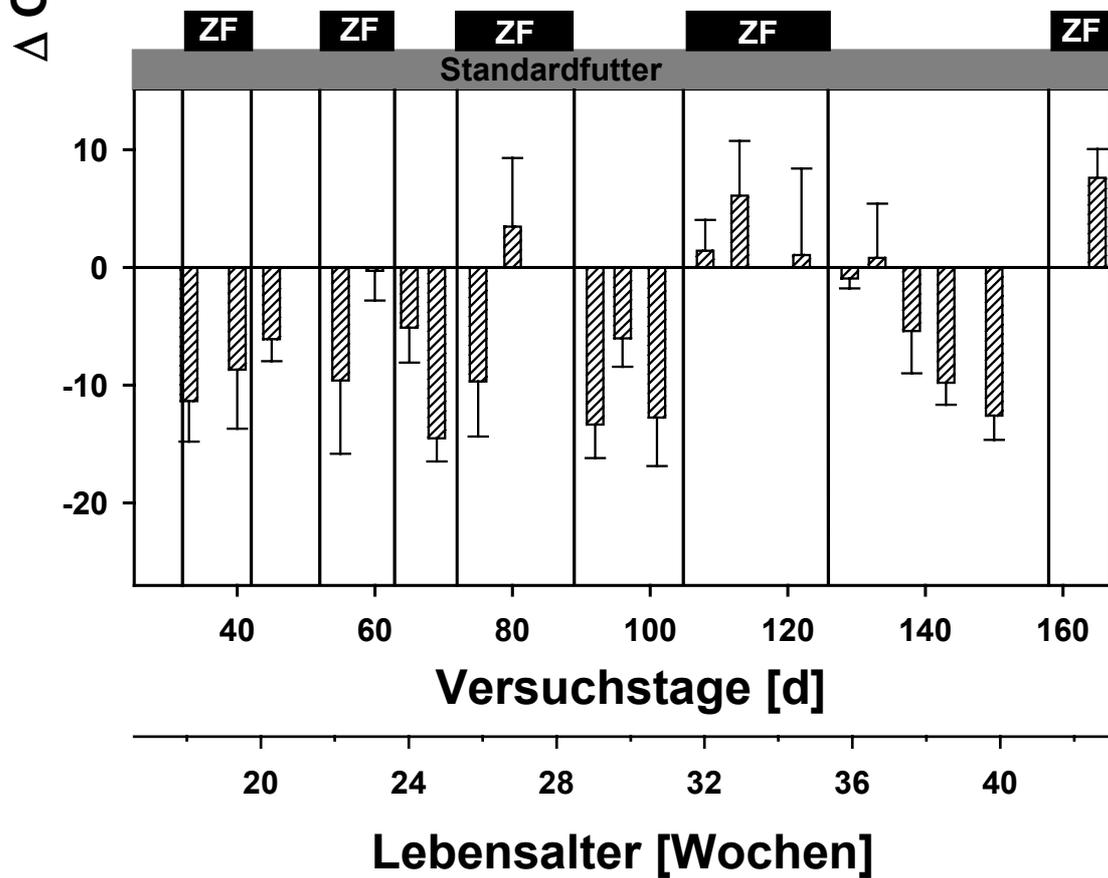
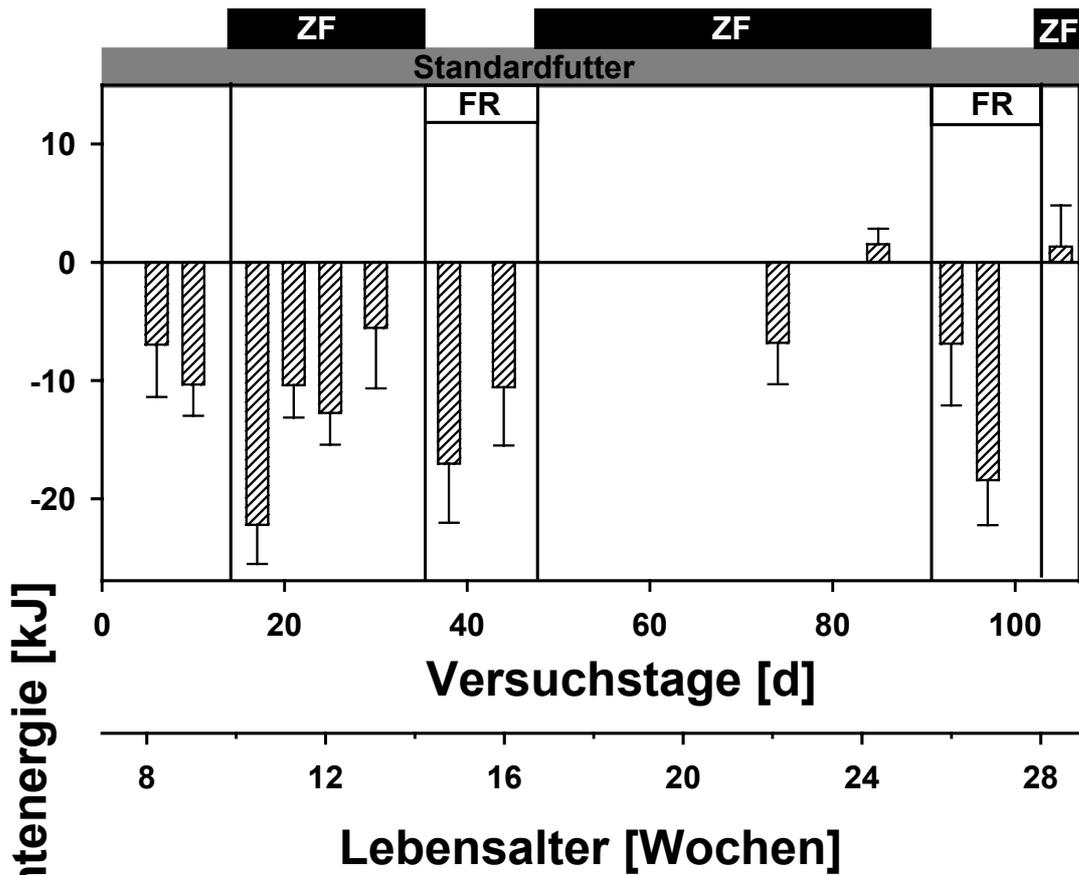
---

<sup>6</sup> Diese Befunde wurden gemeinsam mit Carolin Daniel in einer parallel durchgeführten Diplomarbeit 2002 ermittelt.

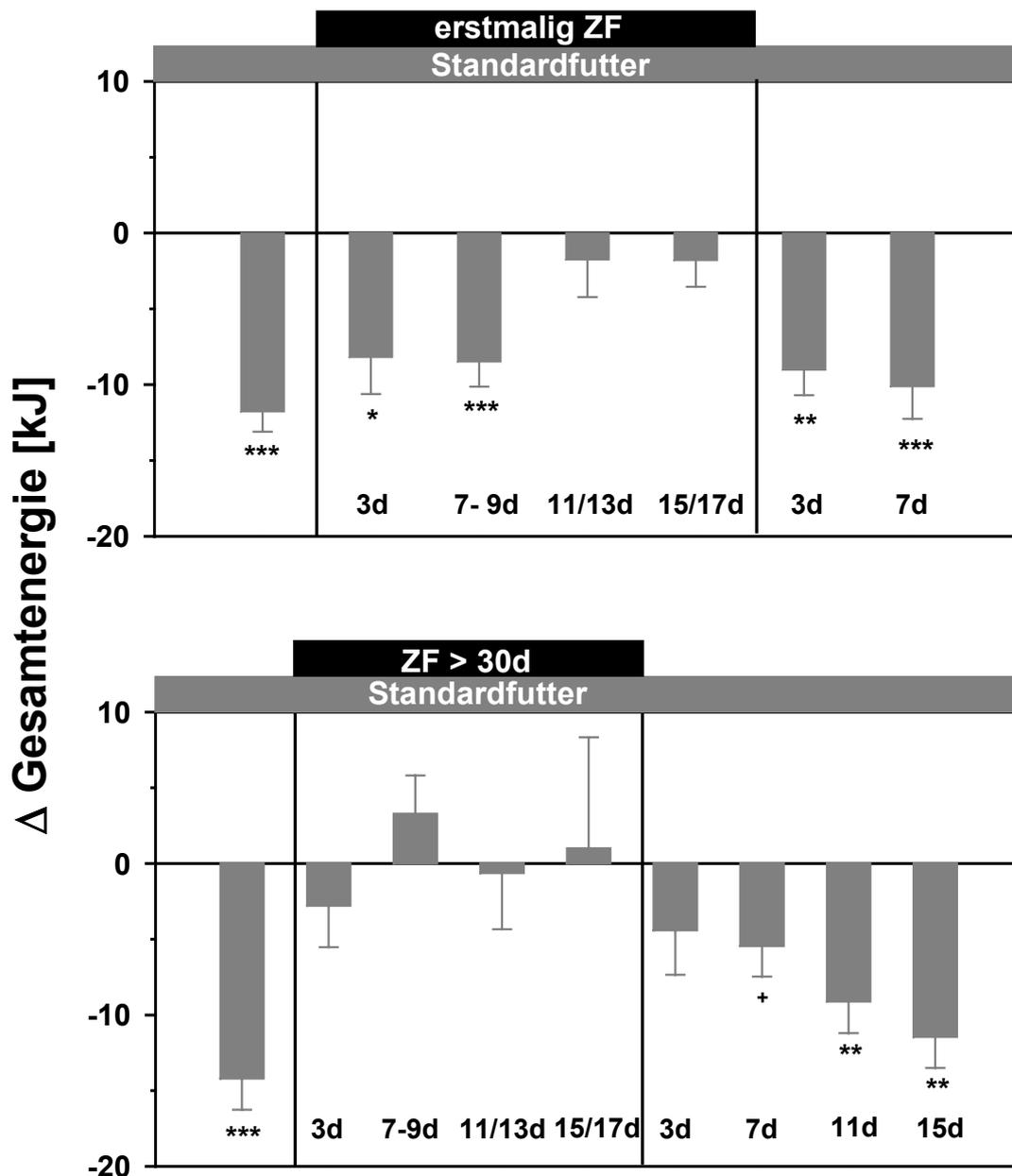
Eine weitere Untersuchung der Leptinresponsivität erfolgte zu einem Zeitpunkt, an dem die Tiere bereits zuvor in zwei bis vier Futterperioden insgesamt für mehr als 30 Tage Zugang zu sensorisch attraktivem Zusatzfutter hatten (Abb. 18 unten). Dabei ergab sich bei ausschließlichem Angebot von Standardfutter zwischen den mit Leptin behandelten Tieren und dem Mittel der Kontrolltiere eine signifikante Differenz in der Gesamtenergieaufnahme von  $-15$  kJ, die sich nicht signifikant von der naiver Tiere unterschied. Bereits nach 3 Tagen erneutem Zugang zu Zusatzfutter konnte jedoch keine signifikante Leptinwirkung mehr nachgewiesen werden. Nach Entzug des Zusatzfutters trat zudem erst wieder nach 11 Tagen eine signifikante Leptin-Wirkung auf, erst nach 15 Tagen wurde wieder die gleiche Reaktionsstärke wie bei naiven Tieren erreicht. Im Vergleich zum erstmaligen Angebot von Zusatzfutter zeigt sich unter diesen Bedingungen sowohl eine deutlich schnellere Abnahme als auch eine deutlich langsamere Wiederherstellung der Leptinresponsivität.

#### *Fazit*

Im Vergleich zu dem erstmaligen Angebot von Zusatzfutter zeigt sich bei wiederholtem Zugang zu Zusatzfutter eine deutlich schnellere Abnahme der Leptinresponsivität in Perioden der Zusatzfütterung. Im Anschluss daran tritt jedoch bei Rückkehr zu ausschließlicher Fütterung von Standardfutter eine deutlich langsamere Wiederherstellung der Leptinresponsivität ein.



**Abb. 17 (vorhergehende Seite):** Veränderung der Leptinresponsivität in Abhängigkeit vom Nahrungsangebot bei Versuchsgruppe G (oben) und H (unten). Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der Differenz in der Gesamtenergieaufnahme zwischen den mit Leptin behandelten Tieren und dem Mittel der Kontrolltiere am Effekttag bei wiederholter eintägiger Leptinbehandlung unter verschiedenen Fütterungsbedingungen. Grauer Balken = Standardfutter, schwarze Balken = Zusatzfutter (ZF), weiße Balken = limitierter Zugang zu Standardfutter (FR).



**Abb. 18:** Veränderung der Leptinresponsivität in Abhängigkeit von der Dauer der Futterperiode während erstmaliger (oben) und wiederholter (unten) Gabe eines Zusatzfutters (ZF, schwarzer Balken) neben dem stets verfügbaren Standardfutter (grauer Balken). **Oben:** naive Tiere, **unten:** Tiere, die zuvor insgesamt mehr als 30 Tage Zugang zu sensorisch attraktivem Zusatzfutter hatten, wobei die Dauer der vorausgehenden Standardfutterperiode mindestens 10 Tage betrug. Dargestellt ist die Differenz in der

*Gesamtenergieaufnahme ( $\pm$  SEM) zwischen den mit Leptin behandelten Tieren und dem Mittel der Kontrolltiere am Effekttag bei wiederholter eintägiger Leptinbehandlung. Die Zeitangaben bezeichnen die Tage seit Beginn der jeweiligen Futterperiode. Die Null-Linie stellt die Veränderung der Futteraufnahme der gleichzeitig behandelten Kontrolltiere der gleichen Versuchsgruppe dar. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,005$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , +  $P = 0,07$  für Unterschiede gegenüber den Kontrolltieren in zweifaktorieller ANOVA (Faktoren Behandlung und Versuchsgruppe).*

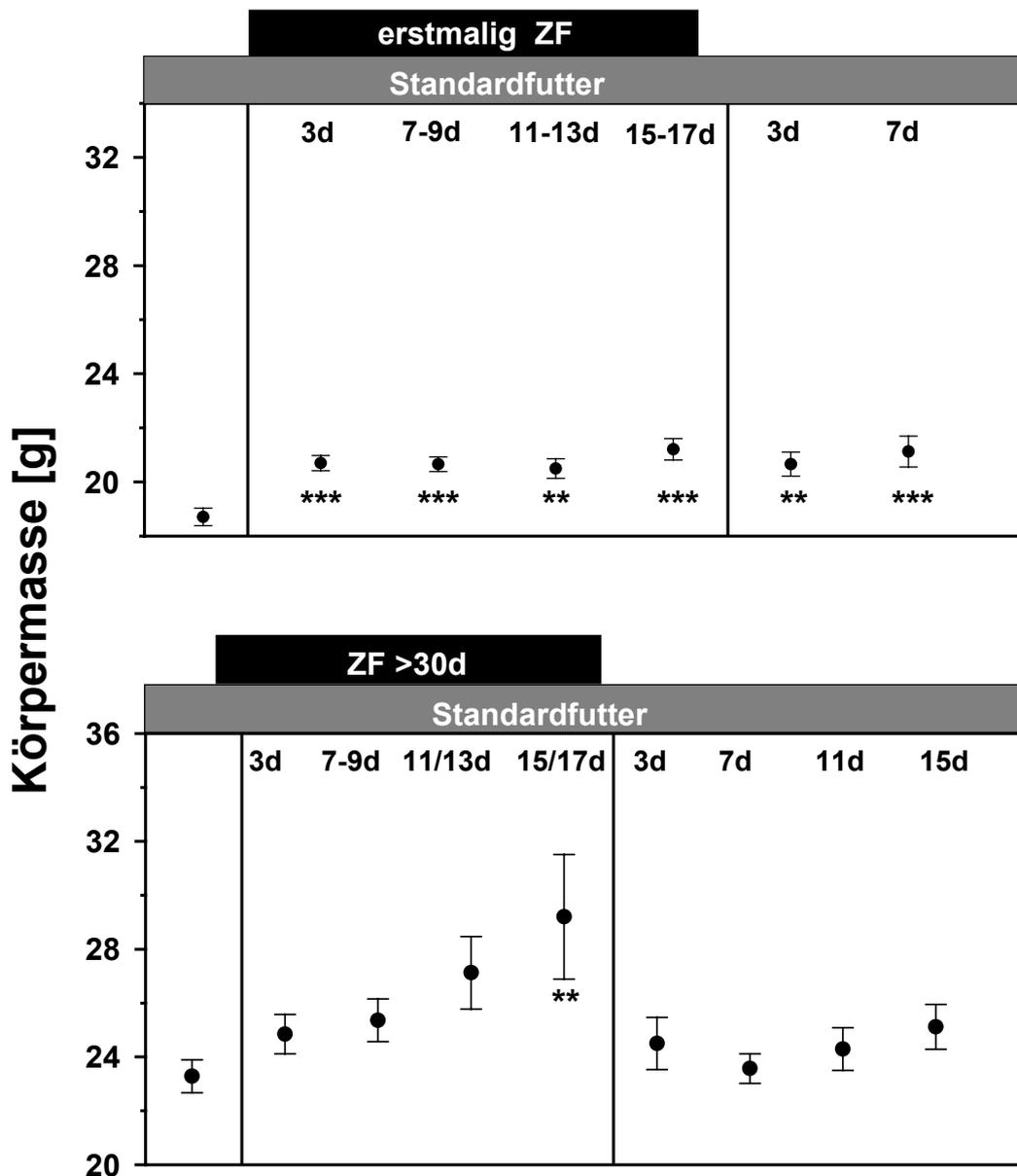
### 3.3.2.2 Fütterungsbedingte Modifikation der Leptinwirkung auf die Körpermasse

Um eventuelle Interaktionen zwischen der Änderung der Leptinresponsivität und der Körpermasse erkennen zu können, wurde die Entwicklung der Körpermasse bei den in Abb. 18 verwendeten Tiere ausgewertet. Für die naiven Tiere ergab sich initial eine mittlere Körpermasse von ca. 19 g (Abb. 19 oben). Beim erstmaligem Angebot von Zusatzfutter kam es bereits ab dem dritten Tag zu einer signifikanten Erhöhung der mittleren Körpermasse um ca. 2 g (10%) im Vergleich zu der naiver Tiere ( $P < 0,001$ ), die auch nach Entzug des Zusatzfutters innerhalb des untersuchten Zeitraumes von 7 Tagen bestehen blieb ( $P < 0,01$ ). Dabei war bei erstmaligem Angebot von Zusatzfutter der Anstieg der Körpermasse mit etwa 2 g in zwei Wochen jedoch sehr gering.

Zu einem Zeitpunkt, an dem die Tiere bereits zuvor über mehr als 30 Tage Zugang zu Zusatzfutter hatten (Abb. 19 unten), betrug die mittlere Körpermasse bei ausschließlichem Angebot von Standardfutter ca. 23 g und unterschied sich somit signifikant von der naiver Tiere ( $P < 0,001$ ). Drei Tage nach Beginn der Zusatzfütterung war die Körpermasse um ca. 1,5 g angestiegen, doch aufgrund der nun größeren Streuung war der Unterschied zu dem Ausgangswert nicht signifikant. In den folgenden Tagen stieg die Körpermasse noch weiter an und erreichte etwa 12 Tage nach Futterwechsel mit ca. 27 g einen Zuwachs um ca. 4 g (ca. 15%). Am Ende der Zusatzfutterperiode erreichte die Veränderung der Körpermasse nach einem 25%igen Anstieg auf einen Wert von 29 g das Signifikanzniveau ( $P < 0,05$ ). Dabei war bei wiederholtem Angebot von Zusatzfutter der Anstieg der Körpermasse von etwa 6 g in zwei Wochen im Vergleich zu dem naiver Tiere deutlich stärker ausgeprägt. Nach Entzug des Zusatzfutters sank die Körpermasse bereits nach 3 Tagen auf einen Wert ab, der das Niveau des Ausgangswertes lediglich um 5% überstieg und sich davon nicht mehr signifikant unterschied.

Im Vergleich zu dem erstmaligen Angebot von Zusatzfutter zeigt sich bei wiederholtem Zugang zu Zusatzfutter eine deutlich stärkere Zunahme der Körpermasse in Perioden der Zusatzfütterung, die jedoch aufgrund der großen Streuung das Signifikanzniveau später

erreicht als bei erstmaligen Angebot von Zusatzfutter. Dabei ist die Streuung der Einzelwertwerte in Phasen mit Zusatzfutter besonders ausgeprägt. Im Anschluss daran tritt bei ausschließlicher Fütterung von Standardfutter eine schnelle Reduktion der Körpermasse ein, so dass sich die Werte im Verlauf dieser Standardfütterungsperiode ebenso wie bei Tieren mit erstmaligem Zugang zu Zusatzfutter nur geringfügig über dem Ausgangsniveau stabilisieren.



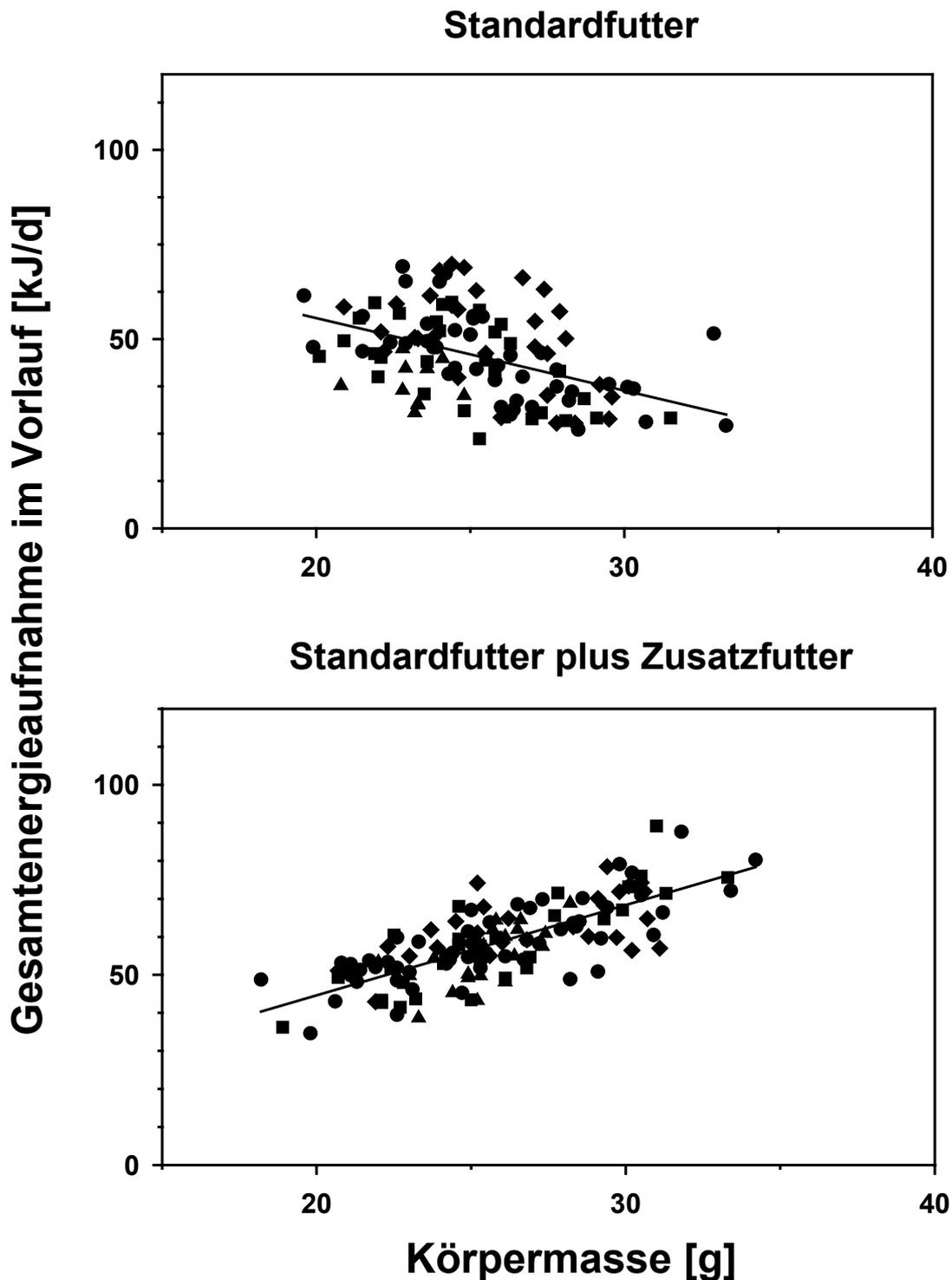
**Abb. 19:** Veränderung der Körpermasse in Abhängigkeit von der Dauer der Futterperiode während erstmaliger (oben) und wiederholter (unten) Gabe eines Zusatzfutters (ZF, schwarzer Balken) neben dem stets verfügbaren Standardfutter (grauer Balken.) Oben: naive Tiere, unten: Tiere, die zuvor insgesamt mehr als 30 Tage Zugang zu Zusatzfutter hatten, wobei die Dauer der vorausgehenden Standardfutterperiode mindestens 10 Tage betrug. Dargestellt ist die im Vorlauf von der Leptinbehandlung unbeeinflusste

*Körpermasse der für die Untersuchung von Veränderung der Leptinresponsivität verwendeten, mit Leptin behandelten Tiere (siehe Abb. 15). Die Zeitangaben bezeichnen die Tage seit Beginn der jeweiligen Futterperiode. \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  für Unterschiede zum Ausgangswert auf Standardfutter (einfaktorieller ANOVA).*

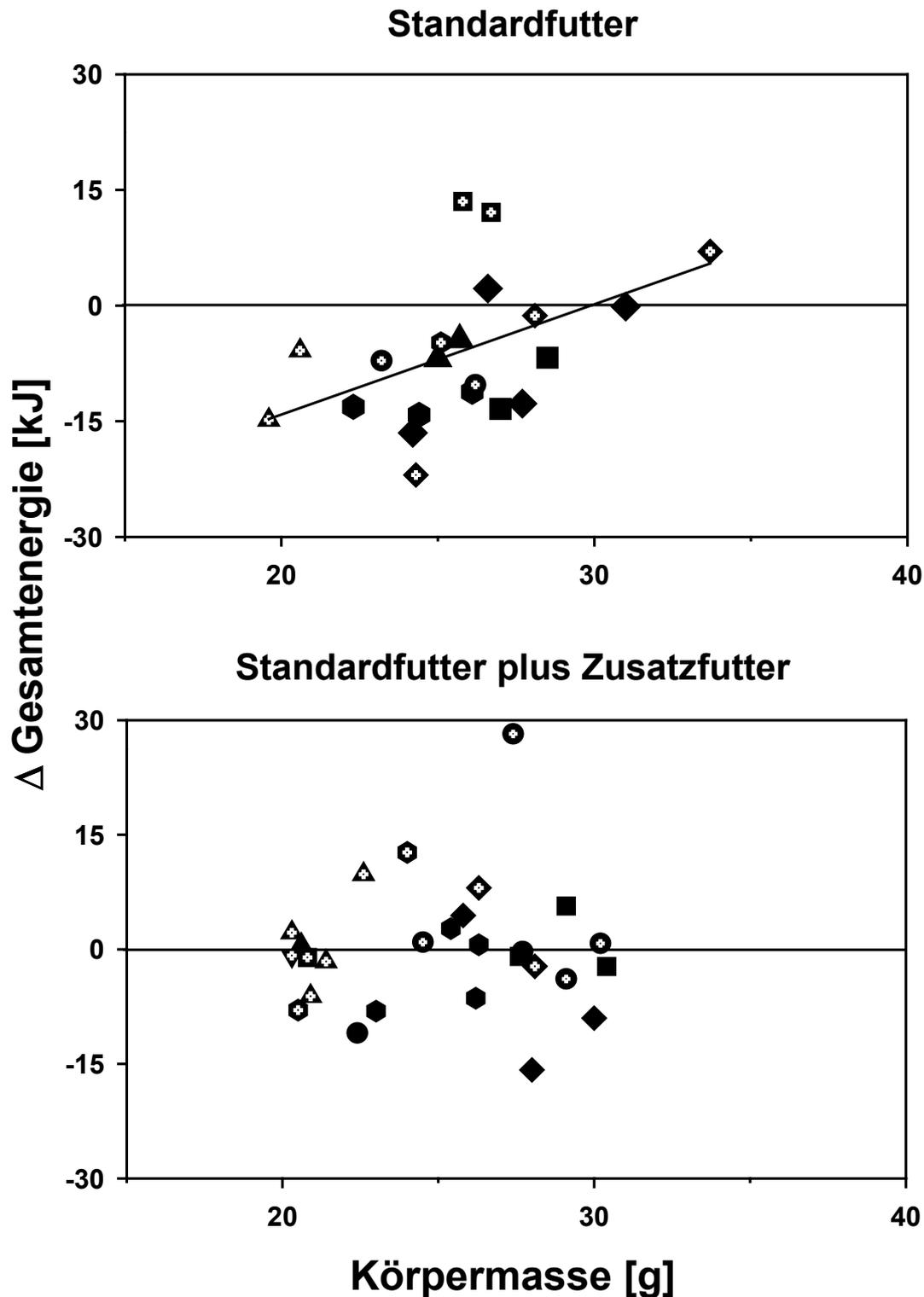
### **3.3.3 Die Körpermasse als Bezugswert für Leptinwirkung und Gesamtenergieaufnahme im Vorlauf**

Setzt man jeweils 5 bzw. 6 Tage nach Futterwechsel die im Vorlauf von der Leptinbehandlung noch unbeeinflusste Gesamtenergie der Tiere pro Tag in Bezug zu ihrer Körpermasse zu diesem Zeitpunkt (Abb. 20), ist eine signifikante Korrelation zu erkennen ( $P < 0,001$ ). Diese fällt jedoch nach dem Wechsel zu Standardfutter negativ (Abb. 20 oben) und nach dem Wechsel zu Zusatzfutter (Abb. 20 unten) positiv aus. Im Gegensatz zu den zuvor dargestellten Unterschieden sowohl in der zeitlichen Änderung der Leptinresponsivität (Abb. 18) wie in der Entwicklung der Körpermasse (Abb. 19) zwischen Tieren mit erstmaligem Zugang zu Zusatzfutter und Tieren, denen bereits mindestens 30 Tage lang Zusatzfutter angeboten wurde, hatte die Gesamtdauer der hochkalorischen Zusatzfütterung keinen erkennbaren Einfluss auf den Zusammenhang zwischen Futteraufnahme und Körpermasse (nicht gezeigt), so dass in Abb. 20 eine gemeinsame Darstellung erfolgte. Beide Korrelationen verdeutlichen generell den Einfluss des Nahrungsangebotes auf den Zusammenhang zwischen Körpermasse und aufgenommener Gesamtenergie: Bei Fütterung von Standardfutter verhält sich die Futteraufnahme umgekehrt proportional zur Körpermasse der Tiere, d.h. leichtere Tiere zeigen eine höhere Energieaufnahme. Während einer hochkalorischen Zusatzfütterung erhält man ein gegenteiligen Ergebnis, da hier die schwersten Tiere das meiste Futter aufnehmen.

Nach den Messungen während Leptinbehandlungen, die 6 bzw. 7 Tage nach dem Entzug des Zusatzfutters durchgeführt wurden, war die Körpermasse am Tag vor der Injektion umgekehrt mit der Leptinresponsivität korreliert ( $P < 0,05$ ), d.h., dass die Leptinwirkung bei leichten Tieren stärker ausgeprägt ist als bei schweren (Abb. 21 oben). Wurde neben dem Standardfutter ein Zusatzfutter angeboten, konnte 6 bzw. 7 Tage nach dem Futterwechsel keine Korrelation zwischen Körpermasse und Leptinresponsivität festgestellt werden (Abb. 21 unten), die Tiere scheinen unabhängig von der Körpermasse keine Leptinwirkung auf die Futteraufnahme mehr zu zeigen. Auch hier zeigte sich kein Einfluss der Gesamtdauer der hochkalorischen Zusatzfütterung auf den Zusammenhang der beiden untersuchten Parameter (nicht gezeigt), so dass die Darstellung gemeinsam erfolgte.



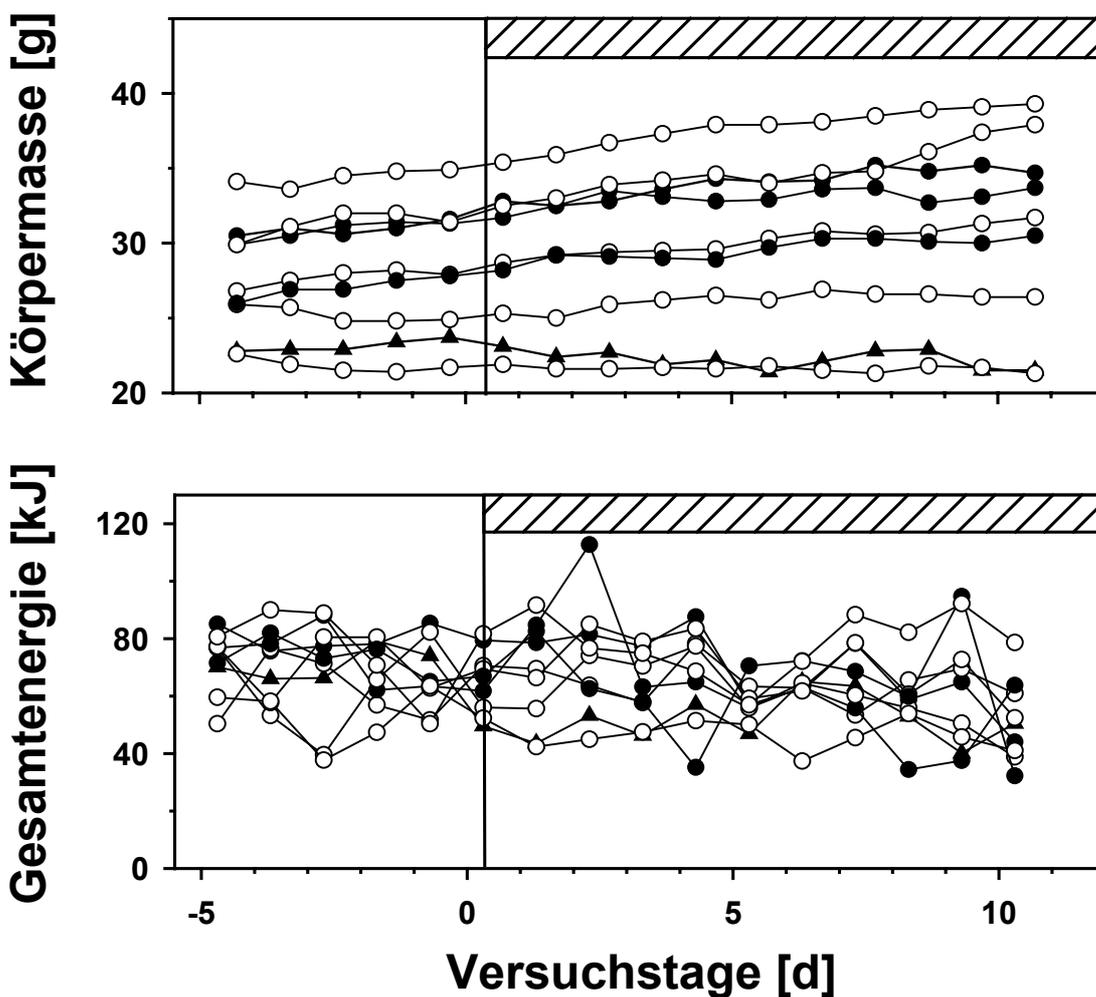
**Abb. 20:** Korrelation zwischen der täglichen Gesamtenergieaufnahme und der Körpermasse bei Versuchsgruppe H sowie 3 weiteren, in einer parallel laufenden Diplomarbeit untersuchten Versuchsgruppen (siehe 2.5.5). Dargestellt ist die Beziehung zwischen den Mittelwerten der Gesamtenergieaufnahme über den 4. und 5. bzw. 5. und 6. Tag nach Futterwechsel und der Körpermasse am 5. bzw. 6. Tag einer Periode mit ausschließlichem Angebot von Standardfutter im Anschluß an eine Fütterungsperiode mit Standardfutter plus Zusatzfutter (oben) bzw. bei dem Angebot von Standardfutter plus Zusatzfutter im Anschluß an Fütterung von ausschließlich Standardfutter (unten). **Oben:** (N=113,  $y = -1,92x + 93,85$ ,  $r = -0,45$ ,  $P < 0,001$ ). **Unten:** (N=136,  $y = 2,37x - 2,82$ ,  $r = 0,75$ ,  $P < 0,001$ ). Verschiedene Symbole kennzeichnen die unterschiedlichen Versuchsgruppen.



**Abb. 21:** Differenz in der Gesamtenergieaufnahme zwischen den mit Leptin behandelten Tieren und dem Mittel der Kontrolltiere am Effekttag als Funktion der Körpermasse am Vortag der Leptinbehandlung. Einzeltiere sind durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet. **Oben:** Seit 6 bzw. 7 Tagen Fütterung von Standardfutter im Anschluß an eine Fütterungsperiode mit Standardfutter plus Zusatzfutter ( $y = 1,43x - 42,72$ ,  $r = 0,45$ ,  $P < 0,05$ ). **Unten:** Seit 6 bzw. 7 Tagen Fütterung von Standardfutter plus Zusatzfutter im Anschluß an Fütterung von ausschließlich Standardfutter.

### 3.3.4 Effekte einer zehntägigen Leptinbehandlung auf Körpermasse und Gesamtenergieaufnahme bei leptinresistenten Tieren mit diätinduzierter Adipositas

Zur Untersuchung der Effekte einer langfristigen Leptinbehandlung mit einer Tagesdosis von  $200 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  auf die Gesamtenergieaufnahme und die Entwicklung der Körpermasse bei Tieren, die aufgrund eines periodischen Wechsels des Nahrungsangebotes bei eintägigen Leptinbehandlungen eine diätinduzierte Leptinresistenz zeigen, wurde bei 4 Tieren aus Versuchsgruppe G nach 140 Versuchstagen mit periodischen Wechseln des Nahrungsangebotes als Pilotstudie eine Leptinbehandlung über einen Zeitraum von 10 Tagen durchgeführt (Abb. 22). Um festzustellen, ob Leptin eine unterschiedliche Wirkung auf die Aufnahme süßer oder nicht süßer Nahrung hat, standen den Tieren direkt im Anschluss an eine Zusatzfütterung mit ZF 1 sechs Tage vor und während des gesamten Behandlungszeitraumes neben dem Standardfutter zwei verschiedenen Zusatzfuttersorten, bei denen der Kohlenhydrat-Anteil einmal aus Saccharose (= ZF 1) und einmal aus Stärke (= ZF 2) bestand, zur Verfügung.



**Abb. 22 (vorhergehende Seite):** Verlauf von Körpermasse und aufgenommener Gesamtenergie bei mit Leptin behandelten (●) und Kontrolltieren (○) während Fütterung von Standardfutter plus Zusatzfutter in einer Kombination aus zwei Sorten, bei der der Kohlenhydrat-Anteil einmal aus Saccharose und einmal aus Stärke bestand. Gezeigt sind die Daten von Versuchsgruppe G (n=9) während des 5-tägigen Vorlaufs und der 10-tägigen Behandlungsperiode (Balken). ▲ = Tier mit der stärksten Absenkung der Futteraufnahme (siehe Text).

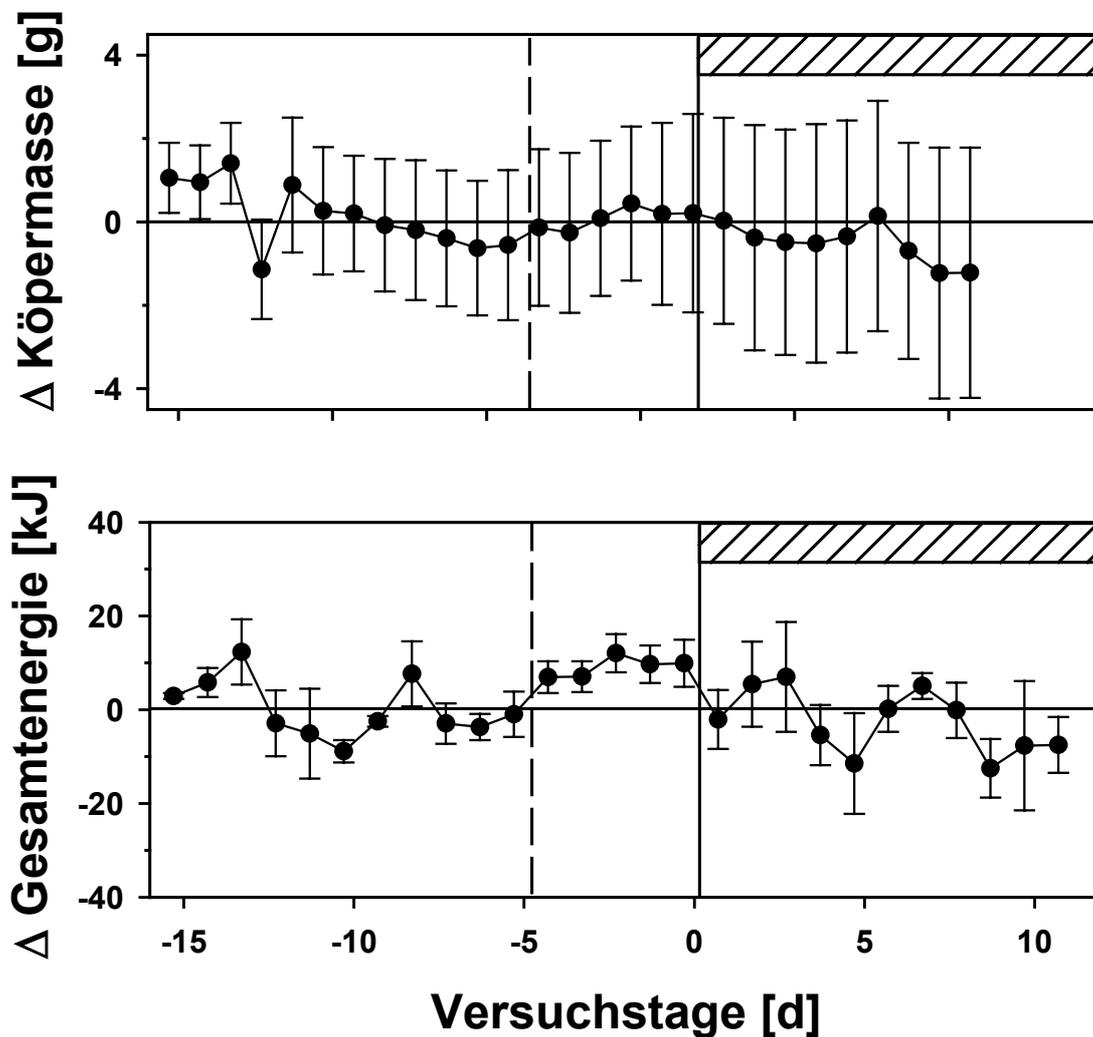
Zu Beginn des Vorlaufes dieser Zusatzfütterungsperiode lag die tägliche Energieaufnahme der Tiere bei etwa 50-70 kJ. Es kam zu einem steten Körpermassenzuwachs, der während der insgesamt 16-tägigen Zusatzfütterungsperiode von zwei Sorten Zusatzfutter bei einzelnen Tieren bis zu 6,5 g betrug, sowie zu einer extrem hohen Variabilität der Körpermasse, die sich von 11,5 g zu Beginn des Vorlaufes auf bis zu 17,8 g bei Versuchsende innerhalb einer Versuchsgruppe ingezüchteter Tieren gleichen Alters und Geschlechts steigerte. Auf mögliche Unterschiede in der Aufnahme der beiden angebotenen Zusatzfuttersorten wird später eingegangen.

#### 3.3.4.1 Leptineffekte auf die Körpermasse und die Gesamtenergieaufnahme

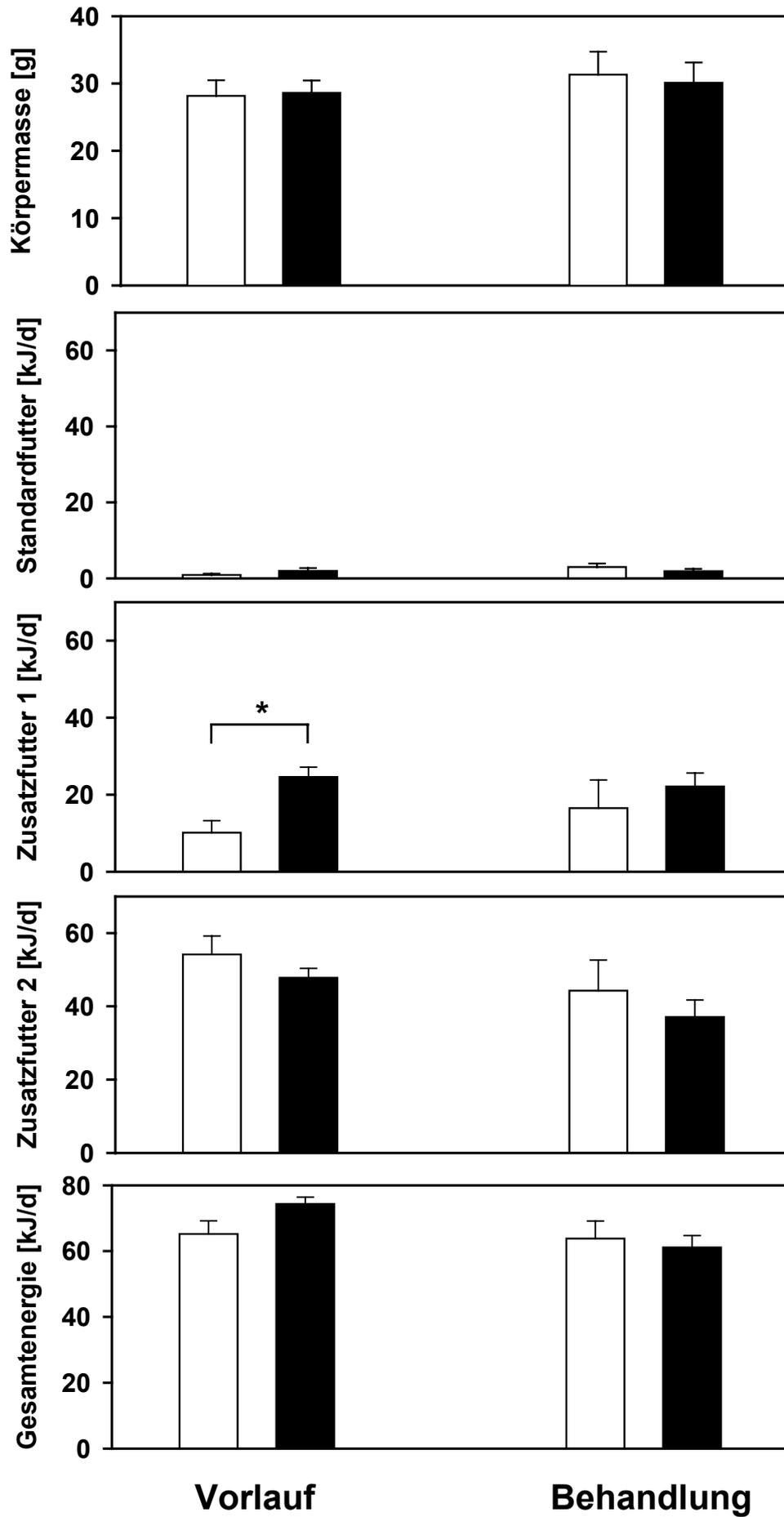
Im Rahmen der 10-tägigen Leptinbehandlung wurde nur bei einem der 4 Tiere bereits ab dem 1. Behandlungstag ein geringes Absinken der Körpermasse verzeichnet, während sich die Körpermasse der übrigen Tiere erst ab dem 8. Behandlungstag leicht reduzierte. Dieses in Abb. 22 durch ein ▲ gekennzeichnete Einzeltier besaß im Vorlauf die geringste Körpermasse der behandelten Tiere. Die Körpermasse der mit Leptin behandelten Gruppe unterschied sich insgesamt während des Behandlungszeitraumes jedoch nicht signifikant von der der zugehörigen Kontrolltiere.

Die Leptinreaktion bei dem gekennzeichneten Einzeltier fiel auch hinsichtlich der mittleren täglichen Gesamtenergieaufnahme mit einer Reduktion um -19 kJ im Vergleich zu der mittleren Differenz von -13 kJ zwischen der Leptinbehandlungsgruppe und dem Kontrollmittel entsprechend stark aus. Dieses Einzeltierbeispiel verdeutlicht, dass bei solchen extrem inhomogenen Versuchsgruppen die Betrachtung der mittleren Abweichung vom Mittelwert der Kontrolltiere (Abb. 23) eine wenig angemessene Darstellungsform ist. Trotz dieser Inhomogenität zeigt sich in Abb. 23, dass die Gesamtenergieaufnahme der Leptinbehandlungsgruppe, die im Vorlauf leicht erhöht ist und während den

vorhergehenden 10 Tagen der Kontrollgruppe entsprach, in der Behandlungsperiode zunehmend unter die der Kontrollgruppe absinkt.



**Abb 23:** Mittelwerte ( $\pm$  SE) der Differenz in der Körpermasse (oben) und in der aufgenommenen Gesamtenergie (unten) zwischen den mit Leptin behandelten Tieren und dem Mittel der Kontrolltiere während Fütterung von Zusatzfutter in einer Kombination aus zwei Sorten, bei der der Kohlenhydrat-Anteil einmal aus Saccharose und einmal aus Stärke besteht. Gezeigt sind die Daten von Versuchsgruppe G (N=9) vor und während der 10-tägigen Leptinbehandlungsperiode (Balken). Die Fütterung von zwei Sorten Zusatzfutter beginnt einen Tag vor dem Vorlauf, davor erhielten die Tiere nur die Sorte Zusatzfutter, bei der der Kohlenhydrat-Anteil aus Stärke besteht. Die Null-Linie stellt jeweils die Werte der gleichzeitig behandelten Kontrolltiere dar. Durchgehende senkrechte Linien kennzeichnen den Beginn der Leptinbehandlung, unterbrochene den Beginn des ausgewerteten Vorlaufs.



**Abb. 24 (vorhergehende Seite):** Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der Körpermasse zu Beginn und Ende des Behandlungszeitraumes sowie der Aufnahme von Standardfutter, Zusatzfutter 1 und 2 und der Gesamtenergie während Vorlauf und Leptinbehandlungsperiode. Mit Leptin behandelte Tiere (●), Kontrolltiere (○). \*  $P < 0,05$  in einfaktorieller ANOVA.

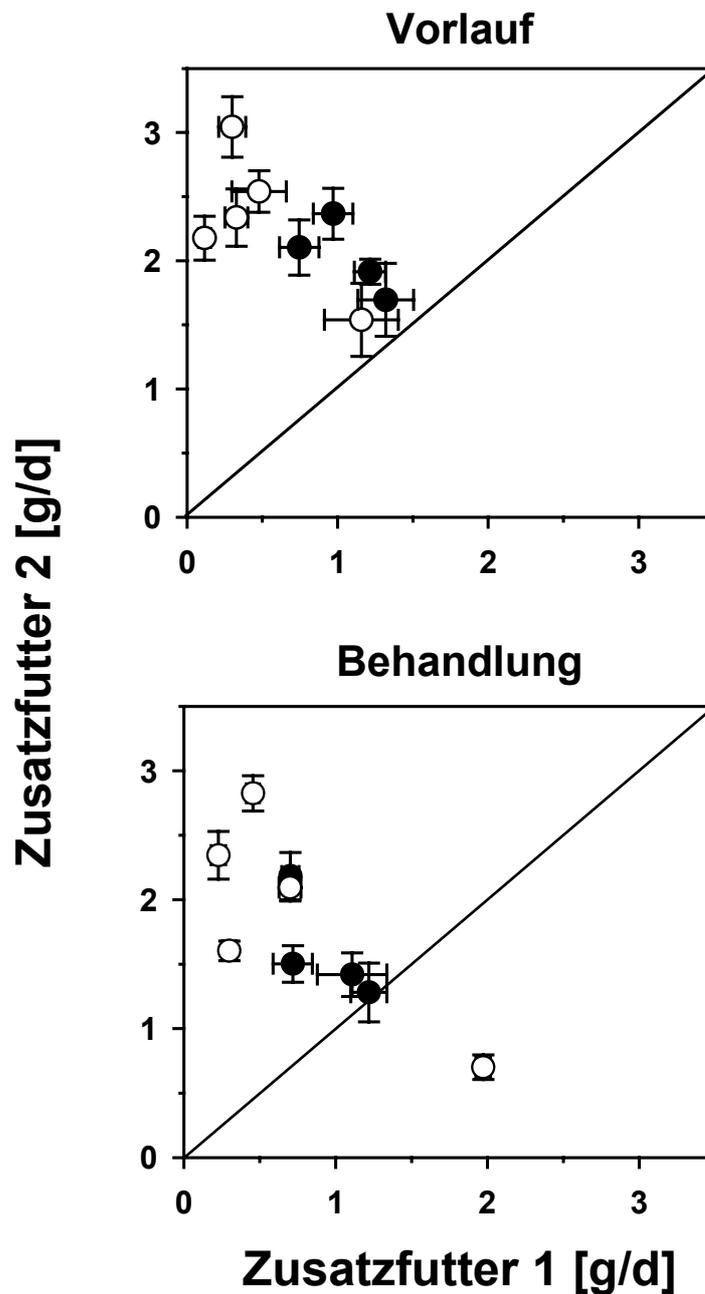
Die Summe der Gesamtenergieaufnahme in den beiden Auswertungszeiträumen zeigt nochmals deutlich, dass die mit Leptin behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren im 5-tägigen Vorlauf mehr und in der Behandlungsperiode weniger Futter aufnahmen (Abb. 24). Beide Abweichungen von den Kontrolltieren erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau. Zur Korrektur dieser Unausgeglichenheit im Vorlauf, wurde in beiden Behandlungsgruppen die Summe der täglichen Abweichungen der Gesamtenergieaufnahme vom Mittel der Kontrolltiere im Behandlungszeitraum mit der im Vorlauf verglichen (nicht gezeigt). Dabei kommt es bei den mit Leptin behandelten Tieren im Laufe des Behandlungszeitraums trotz einer leicht rückläufigen mittleren täglichen Gesamtenergieaufnahme der Kontrolltiere zu einer signifikanten Reduktion ( $P < 0,01$ , einfaktorielle ANOVA) der Futtermenge im Vergleich zu ihren Kontrolltieren.

#### 3.3.4.2 Leptinbedingte Verschiebungen der Anteile von ZF1 und ZF2

Neben der Gesamtenergieaufnahme wurde weiterhin die Aufnahme der einzelnen Futtersorten untersucht. In der Standardfuttersaufnahme war sowohl im Vorlauf als auch in der Behandlungsperiode kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen vorhanden und auch der Vergleich der durchschnittlichen Abweichung der Standardfuttersaufnahme von mit Leptin behandelten Tieren vom Mittel der Kontrolltiere ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Vorlauf und Behandlungsperiode (nicht gezeigt).

Bei Zugang zu den beiden Zusatzfuttersorten wurde generell das nicht süße ZF 2 bevorzugt. Weiterhin zeigte sich bei den aufgrund ihrer Körpermasseverteilung in Leptin- und Kontrollgruppe eingeteilten Tieren bei der späteren Auswertung der Aufnahme der erwähnten Futtersorten für die mit Leptin behandelten Tiere initial eine signifikant größere ( $P < 0,05$ ) Aufnahme des ZF 1 im Vorlauf als für die Kontrolltiere. Dieser Unterschied verwischte sich während der Behandlungsperiode. Eine Untersuchung der durchschnittlichen Abweichung der Aufnahme von ZF 1 von mit Leptin behandelten Tieren vom Mittel der Kontrolltiere konnte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen Vorlauf und Behandlungsperiode nachweisen. Bei der Aufnahme von ZF 2 war

sowohl im Vorlauf als auch in der Behandlungsperiode kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen vorhanden und auch der Vergleich der durchschnittlichen Abweichung der Aufnahme von ZF 2 von mit Leptin behandelten Tieren vom Mittel der Kontrolltiere ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Vorlauf und Behandlungsperiode.



**Abb. 25:** Korrelation zwischen der durchschnittlichen täglichen Aufnahme ( $\pm$  SEM) von süßem Zusatzfutter (Zusatzfutter 1) und Zusatzfutter, in dem die süße Komponente equikalorisch durch Stärke ersetzt wurde (Zusatzfutter 2) während 5-tägigem Vorlauf (oben) und 10-tägigem Behandlungszeitraum (unten) von mit Leptin behandelten ( $\bullet$ ) und Kontrolltieren ( $\circ$ ). Die durchgehende Diagonale dient als Referenzgerade, auf der keine der beiden Futtersorten bevorzugt wird.

Zur Klärung der Frage, ob eine Leptinbehandlung eine unterschiedliche Wirkung auf die Aufnahme von süßem oder nicht süßem Futter hat, wurden die Anteile der 3 verschiedenen Futtersorten im Vorlauf mit denen während des Behandlungszeitraums verglichen (Abb. 25). Im Vorlauf deckten die Tiere der Leptinbehandlungsgruppe ihre aufgenommene Gesamtenergie [kJ] anteilig aus ca. 5% Standardfutter, ca. 30% ZF 1 und 65% ZF 2. Da während des Behandlungszeitraumes die Gesamtenergieaufnahme der mit Leptin behandelten Tieren zu ca. 5% aus Standardfutter, zu ca. 35% aus ZF 1 und zu ca. 60% aus ZF 2-Futter bestand, resultiert aus der 10-tägigen Leptinbehandlung nur eine geringfügige, nicht signifikante Verschiebung in der anteiligen Aufnahme der verschiedenen Futtersorten zugunsten des ZF 1.

#### *Fazit*

Bei den hier untersuchten Tieren mit diätinduzierter Adipositas zeigt sich bei einer 10-tägigen Behandlung ausschließlich in der Abweichung der Gesamtenergieaufnahme ein geringer, aber signifikanter Leptineffekt, ohne dass es dabei zu einer Veränderung der Anteile der 3 Futtersorten kommt. Während eine deutliche Verschiebung der Anteile der 3 Futtersorten anhand dieses Pilotversuches ausgeschlossen werden kann, war die Vorlaufperiode mit gleichzeitiger Fütterung von ZF 1 und 2 zu kurz, um auszuschließen, dass die beobachtete leichte Senkung der Energieaufnahme bei den mit Leptin behandelten Tieren nicht nur eine Folge der im Vorlauf zufällig erhöhten Futteraufnahme gegenüber der Kontrollgruppe war.

## 4 DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand in der Untersuchung der Ursachen für das Entstehen von Adipositas im Tiermodell. Hierbei wurden die Auswirkungen sowohl von thermoneutralen Umgebungstemperaturen als auch des Zugangs zu sensorisch attraktiver, hochkalorischer Zusatznahrung, als zwei für Menschen in Industrienationen charakteristischen Umweltfaktoren, auf die Leptinresponsivität von C57Bl/6J-Mäusen, einem zu diätinduzierter Adipositas neigenden Tierstamm, betrachtet. Die aufgrund widersprüchlicher Literaturangaben vor Beginn der Leptinbehandlungen unter thermoneutralen Bedingungen ermittelte TNZ ergab für den verwendeten C57Bl/6J-Stamm eine 24-h-TNZ zwischen 32 und 34°C. Nachfolgende 10-tägige Leptinbehandlungen bei einer  $T_a$  von 34°C konnten zeigen, dass es im Vergleich zu Befunden, die bei normalen Haltungstemperaturen mit gleicher Dosis ermittelt wurden (Döring 2000), zu einer Verminderung der Leptinwirkung auf die Körperfettspeicher kam. Die Vermittlung der Leptinwirkung erfolgte jedoch temperaturunabhängig durch analoge Mechanismen: So kam es bei *ad libitum* gefütterten Tieren ausschließlich aufgrund einer reduzierten Futteraufnahme zu einer Verringerung der Körperfettdepots, bei Tieren mit limitiertem Futterzugang beruhte die Reduktion der Körperfettmasse dagegen allein auf einer Abschwächung der bei unbehandelten Tieren auftretenden Absenkungen der MR. Die Möglichkeit, dass Leptin nicht nur torporartigen Zuständen sondern unter thermoneutralen Bedingungen bei limitiertem Futterzugang auch einer moderaten, mit einer Nahrungs-limitierung einhergehenden Stoffwechsellenkung entgegenwirken kann, stellt im Hinblick auf die menschliche Lebenssituation einen interessanten Erstbefund dar. Die Befunde bei Tieren mit *ad libitum* Futterzugang deuten außerdem auf eine im Vergleich zu den Untersuchungen bei Kältebelastung (24°C) schwächere leptinbedingte Reduktion der Körperfettmasse hin. Die geringe N-Zahl innerhalb dieser Pilotstudien bedingt jedoch die Notwendigkeit von Folgestudien zur Absicherung dieser Befunde.

Im Hinblick auf den Einfluss des Nahrungsangebotes auf die Adipositas-Entstehung konnte im Rahmen dieser Studie belegt werden, dass die Leptinresponsivität ebenso wie die Körpermasse bei periodischem Zugang zu sensorisch attraktiver hochkalorischer Zusatznahrung, die neben der faserreichen, wenig energiedichten Standard-Nagetierdiät angeboten wurde, sowohl von der Dauer der akuten Fütterungsperiode als auch von der

Gesamtdauer des Angebotes eines solchen Zusatzfutters beeinflusst wird. Dabei zeigten sich allerdings starke individuelle Unterschiede in der Veränderung der Futteraufnahme und Körpermasse, wobei ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Körpermasse vor Beginn der ersten Zusatzfütterungsphase und der zu Versuchsende bestimmten Körpermasse existierte. Dies ist bei einem isogenen Stamm ein Hinweis auf den Einfluss von epigenetischen Faktoren auf die Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas. Im Rahmen der Frage nach der Leptin-induzierten selektiven Hemmung der Aufnahme süßer Futtersorten durch Leptin geht aus einer abschließenden Untersuchung, in der den Tieren sowohl hochkalorische Zusatzfuttersorten mit als auch ohne süßer Geschmackskomponente angeboten wurde, klar hervor, dass eine Beeinflussung der Attraktivität der hier untersuchten Nahrungskomponenten durch eine Leptinbehandlung ausgeschlossen werden kann.

#### **4.1 THERMONEUTRALZONE VON ADULTEN C57BL/6J-MÄUSEN WÄHREND *AD LIBITUM* UND LIMITIERTER FÜTTERUNG**

##### **4.1.1 Beurteilung der bei *ad libitum* Fütterung ermittelten TNZ**

In der vorliegenden Studie wurde für die 24-h-TNZ bei *ad libitum* gefütterten adulten C57Bl/6J-Mäusen ein  $T_a$ -Bereich zwischen 32 und 34°C ermittelt. Dieser  $T_a$ -Bereich liegt klar über der verschiedentlich bei Untersuchungen an adulten C57Bl/6J-Mäusen als thermoneutral erachteten  $T_a$  von 29-30°C (Hoffmann-Götz und Keir 1985 & 1986, Talan et al. 1996), wobei jedoch von den Autoren keine Begründung für die Höhe der verwendeten  $T_a$  angegeben wird. Wenngleich der Grund für die von Boss et al. (1998) verwendete thermoneutrale  $T_a$  von 33°C nicht weiter hinterfragt werden konnte, dient diese Studie dennoch als weiteres Beispiel für die Verwendung einer  $T_a$ , die unmittelbar unterhalb der OKT der in der vorliegenden Untersuchung ermittelten TNZ liegt und somit einen geringstmöglichen thermoregulatorischen Energieverbrauch gewährleistet.

In stammesübergreifenden Studien an adulten Mäusen reichten die als TNZ betrachteten  $T_a$  von 24°C bei Hausmäusen (Bronson et al. 1991) bis zu 35°C bei dem transgenen *uncoupling protein-diphtheria toxin A chain* (UCP-DTA)-Mäusestamm mit genetisch bedingter Adipositas (Melnik et al. 1997), wobei 33°C die am häufigsten als thermoneutral

betrachtete  $T_a$  darstellt (Stanier 1977, Trayhurn 1979, Desautels et al. 1986, Patel et al. 1987, Himms-Hagen und Villemure 1992, Kozak et al. 1994). Prinzipiell müssen als mögliche Einflussgrößen auf die TNZ Unterschiede zwischen den Zuchtstämmen in Betracht gezogen werden, so dass diese Untersuchungen nicht direkt mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie vergleichbar sind. Allerdings liegt die Ursache für diese äußerst verschiedenen Literaturbefunde wahrscheinlich weniger in Stammesunterschieden als in methodischen Unterschieden. So wurden häufig die in vorhergehenden Studien verwendete  $T_a$  ohne Kenntnis der Methode ihrer Bestimmung übernommen. Zum anderen ergeben sich Probleme durch die, aufgrund des Fehlens einer klaren Definition, kontroverse Interpretation der Bedingungen bei der Bestimmung der TNZ. Da in nahezu allen Studien an kleinen Nagern zur Vermeidung eines gedrosselten Hungerstoffwechsels auf eine mehrstündige Fastenzeit vor der Bestimmung der MR verzichtet wurde, bestehen die Unterschiede dabei vor allem im Zeitpunkt der Bestimmung der minimalen RMR, die teilweise tageszeitunabhängig (Trayhurn und James 1978, Trayhurn 1979) und teilweise in der circadianen Ruhephase (Selman et al. 2001, Haim und Zisapel 1999, Marhold und Nagel 1994) ermittelt wurde. Dabei ist zu beachten, dass die minimale RMR als alleiniges Kriterium für die Bestimmung der  $T_a$  mit dem geringsten thermoregulatorischen Energiebedarf nicht ausreicht, da Schwankungen im Bereich der minimalen thermoregulatorischen Aktivität im circadianen Rhythmus so nicht erfasst werden. Der aufgrund dessen in der vorliegenden Untersuchung eingeführte Begriff der 24-h-TNZ, zu dessen Bestimmung die Auswertung von ADMR sowie der Tagesmaxima und -minima herangezogen wurden, wird durch Untersuchungen von Mount (1971) gestützt, in denen sowohl die UKT als auch die OKT bei Albino-Mäusen anhand eines Anstieges der RMR ermittelt werden konnten, die RMR jedoch im Vergleich zu der für Energiebilanz-Untersuchungen relevanten ADMR erheblich niedriger lag.

Der Hysteresis-Effekt, der sich bei nahezu allen bei 34°C bestimmten Parametern zeigte und einen Nebenbefund dieser Studie darstellte, weist auf eine rasche Adaptation an die zuvor eingestellte  $T_a$  hin. Dabei zeigt sich bei dem in aufsteigender  $T_a$ -Folge ermittelten 34°C-Wert eine deutlich negative Energiebilanz, da die MR in beinahe allen Auswertungsformen im Vergleich zu den in absteigender Folge ermittelten Werten höher ist, obwohl sich die Futteraufnahme genau umgekehrt verhält. In diesem Zusammenhang gehen Færvik et al. (2001) davon aus, dass durch die Testung verschiedener  $T_a$  in zufälliger Reihenfolge ein Hysteresis-Effekt vermieden werden kann. Die eigenen Befunde

deuten jedoch darauf hin, dass neben der Dauer der zuvor eingestellten  $T_a$  auch die Länge des Adaptationszeitraumes nach einer  $T_a$ -Änderung eine große Rolle für die Ausprägung eines Hysteresis-Effektes spielt. Dabei stellt der innerhalb dieser Untersuchung bei Veränderung der  $T_a$  verwendete noch relativ kurze Eingewöhnungszeitraum von 3 Stunden, der von der Auswertung unberücksichtigt blieb, im Vergleich zu anderen Literaturbefunden, bei denen der Adaptationszeitraum nur 30 bis 60 min beträgt (Redman et al. 1999, Speakman und Rossi 1999, Selman et al. 2001, Mount 1971), bereits eine Verbesserung dar. Der beobachtete Hysteresis-Effekt zeigt jedoch, dass es trotzdem noch zu einer Beeinflussung der MR während des Messzeitraumes durch die zuvor eingestellte  $T_a$  kommt.

#### **4.1.2 Die UKT als untere Grenze der Zone des minimalen thermoregulatorischen Energieaufwandes**

Aufgrund der Definition der TNZ als einen Bereich mit minimalem thermoregulatorischen Energieaufwand (Kleiber 1961) wurde als Kriterium für die Bestimmung der UKT die Erhöhung der MR (Hart 1971, Withers 1992, Marhold und Nagel 1994) infolge einer erhöhten Wärmeproduktion durch Zittern, zitterfreie Thermogenese oder gesteigerte Aktivität (Jansky 1973) verwendet. Die in der vorliegenden Untersuchung anhand des bei 29°C beobachteten, signifikanten Anstieges des Tagesminimums der MR festgelegte UKT zwischen 29 und 31°C befindet sich am oberen Ende des von Lacy und Lynch (1979) sowie Speakman und Rossi (1999) bestimmten UKT-Bereiches von 25-30°C für behaarte Wildtyp-Mäuse, sowie des von Gordon (1993) anhand vorhergehender Studien postulierten  $T_a$ -Bereiches von 28-30°C. Eine von Selman et al. (2001) ermittelte UKT für Wildtyp-Mäuse von 28°C lag dagegen bei einem vergleichsweise niedrigen Wert. Dabei muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass das Ergebnis der letztgenannten Studie aufgrund eines methodisch nicht nachvollziehbaren Vergleiches zwischen zwei willkürlich gewählten  $T_a$  kritisch beurteilt werden muss. In einer von Herrington (1940) durchgeführten Untersuchung konnte die UKT aufgrund von zwischen 31 und 32°C fehlenden Daten nur relativ ungenau zwischen 30 und 33°C eingegrenzt werden. Allerdings wurden in dieser Studie bereits 6 Stunden für die Messung der MR bei jeweils einer  $T_a$  verwendet, also eine wesentlich längere Zeitspanne als in den meisten Folgestudien. Da Ziel der Bestimmung der 24-h-TNZ die Ermittlung der Zone des geringsten thermoregulatorischen Aufwandes in Langzeitstudien war, kann davon ausgegangen werden, dass die in der vorliegenden

Untersuchung anhand von Messungen der MR über 2-5 Tage bei gleicher  $T_a$  ermittelte UKT ein zuverlässigeres Ergebnis darstellt als in Kurzzeitmessungen ermittelte Werte.

#### 4.1.3 Die OKT als Grenzwert für das Einsetzen von Hitzestress

Vor der Selektion von Kriterien zur Bestimmung der OKT muss darauf hingewiesen werden, dass die häufig verwendete Annahme eines Anstiegs der MR bei Überschreiten der OKT (Mount 1971, Withers 1992, Eckert 1993, Gordon 1993, Marhold und Nagel 1994, Færvik et al. 2001) bei kleinen Nagetieren kritisch zu betrachten ist, da bei ihnen die regulatorische Erhöhung der evaporativen Wärmeabgabe über das Befeuchten des Haarkleides mit Speichel erfolgt (Gordon 1993), diese Wärmeabwehrreaktionen jedoch erst kurz vor Beginn einer Hitzestress-bedingten Agonie einsetzt. In der vorliegenden Studie trat diese Verhaltensweise auch bei einer  $T_a$  von 36°C nicht auf. Wie vorhergehende Untersuchungen belegen, besteht jedoch andererseits auch bei Nagetieren die Möglichkeit, hohe  $T_a$  mit Hilfe einer über kurze Zeiträume kompensatorisch erhöhten Körperkern-temperatur ( $T_c$ ) kurzfristig zu tolerieren (Hart 1971, Hu et al. 1996). Weiterhin zeigt die vorliegende Arbeit, dass der hier untersuchte C57Bl/6J-Mäusestamm in der Lage ist, der ansteigenden  $T_a$  mit einer Erniedrigung der ADMR zu begegnen. Da also einsetzender Hitzestress nicht zwangsläufig mit einer Erhöhung der MR einhergeht, stellt der Verlauf der MR kein verlässliches Kriterium für die Festlegung der OKT dar (Gordon 1993), so dass in der vorliegenden Studie die  $T_a$ -abhängigen Verläufe von Futteraufnahme und Körpermasse als zusätzliche physiologische Größen für das Einsetzen von Hitzestress (Mitchell und Carlisle 1992) verwendet werden.

Oufara et al. (1987) ermittelten die OKT bei 40 g schweren, weissen (OF1-) Mäusen, analog zu der Definition des *Glossary of terms for Thermal Physiology* (2001), aufgrund eines Anstiegs der evaporativen Wärmeabgabe bei einer  $T_a$  von 26°C, bei der sich die MR, die erst bei Erreichen von 30°C anstieg, noch in ihrem Minimum befand. Die Tiere der genannten Studie waren jedoch fast doppelt so schwer wie die hier verwendeten Tiere, zudem fehlen Angaben über Dauer und Reihenfolge der  $T_a$ -Expositionen. Insbesondere erfolgte die Messung der genannten Parameter in der Dunkelheit, ohne dass jedoch klar-gestellt wurde, ob sich die Tiere zum Zeitpunkt der Messung in ihrer circadianen Licht- oder Dunkelphase befanden. Bereits 1973 wies Mount auf diese Probleme hin, die sich durch uneinheitliche methodischen Verfahren zur Bestimmung der OKT ergeben und auf

die damit verbundenen Schwierigkeiten bei der Interpretation von Ergebnissen. Folglich ist die in vielen Studien vorkommende Verwendung von bereits in vorhergehenden Untersuchungen ermittelten oberen Grenzwerten der TNZ ohne Kenntnis der methodischen Vorgehensweise problematisch.

Die in der vorliegenden Untersuchung anhand eines rapiden Abfalls der Futteraufnahme bei 36°C und einer davon nachhaltig beeinflussten Körpermasse ermittelte OKT zwischen 35 und 36°C liegt im Vergleich zu der von Mount (1971) postulierten OKT von 30-32°C bei Albino-Mäusen deutlich höher. Dabei ist allerdings hervorzuheben, dass zum einen die hier untersuchten Tiere bereits langfristig an  $T_a$  von 30°C und mehr adaptiert waren. Zum anderen ist die von Mount anhand eines deutlichen Anstiegs der MR bei einer  $T_a$ -Veränderung von 30 auf 32°C ermittelte OKT insofern kritisch zu beurteilen, als die bei 32°C ermittelten Werte zur Vermeidung einer Hyperthermie auf ein Messintervall von nur 5 Stunden beschränkt sind, während die bei  $T_a$  unterhalb von 32°C ermittelten Werte auf einem Messintervall von 24 Stunden basieren. Folglich findet unter diesen Voraussetzungen ein strenggenommen nicht zulässiger Vergleich zwischen der ADMR und unabhängig vom circadianen Rhythmus ermittelten Daten der MR statt. Weiterhin gelang es auch Marhold und Nagel (1994), unter Registrierung der Herz- und Atemfrequenz sowie der  $T_c$ , bei Überschreiten der OKT zwischen 32,5 und 35°C einen Anstieg der BMR bei Ratten nachzuweisen, die ebenfalls das nagetierspezifische Befechten des Haarkleides zeigen. Dabei ist ein Vergleich von Ratten und Mäusen aufgrund der tierartsspezifisch unterschiedlichen Größe jedoch sehr problematisch, da davon auszugehen ist, dass die TNZ der Ratte deutlich niedriger liegt. So kann auch bei den hier untersuchten Mäusen bis zu einer  $T_a$  von 36°C kein Anstieg der MR verzeichnet werden, obwohl die Futteraufnahme und die Körpermasse eindeutig auf das Überschreiten der OKT hinweisen. Die vorliegende Studie liefert damit klare Hinweise für die Notwendigkeit des Einbeziehens von ergänzenden Kriterien der Verhaltensphysiologie (Cabanac 1972, Åstrand und Rodahl 1986) zur Bestimmung der OKT. Untersuchungen, die sich ausschließlich auf die Messung der MR beschränken, können somit das Fehlen von einsetzendem Hitzestress als eine wichtige Voraussetzung nicht gewährleisten. Zudem weist der Vergleich der eigenen Messungen mit Literaturbefunden deutlich auf die Problematik hin, die in der Verwendung von Kurzzeitmessungen zur Ermittlung der Obergrenze der Zone des geringsten thermoregulatorischen Aufwandes für Langzeit-Energiebilanzstudien besteht.

#### 4.1.4 Einfluss einer limitierten Fütterung auf die TNZ von C57Bl/6J-Mäusen

In der Literatur kommt die Verknüpfung einer thermoneutralen  $T_a$  mit einer limitierten Fütterung äusserst selten vor. Bei der von Williams et al. (2002) verwendeten, thermoneutralen  $T_a$  von 30°C bei männlichen, 25 Wochen alten C57Bl/6J-Mäusen mit limitiertem Futterzugang, die 60% der Futtermenge von *ad libitum* gefütterten Tieren bei gleicher  $T_a$  erhielten, wurde als thermoneutrale  $T_a$  die von *ad libitum* gefütterten Tiere verwendet. Da Mäuse mit limitiertem Futterzugang unter Kältebelastung torporartige Absenkungen ihrer MR zeigen, diese jedoch bei der verwendeten  $T_a$  von 30°C nicht auftraten, obwohl die Tiere im Vergleich zur *ad libitum*-Fütterung eine signifikante Reduktion der Körpermasse zeigten, ist davon auszugehen, dass die in der genannten Untersuchung für *ad libitum* gefütterte Tiere postulierte thermoneutrale  $T_a$  auch bei limitierter Fütterung in der TNZ der Tiere lag. Die absolute Futteraufnahme dieser Tiere liegt jedoch mit ca. 2,7 g ungefähr doppelt so hoch wie die in der vorliegenden Untersuchung verwendete von 1,3 g (70% der von den gleich alten *ad libitum* gefütterten Tieren bei gleicher  $T_a$  aufgenommenen Futtermenge), wobei die Autoren die Menge von 2,7 g bei einem Energiegehalt des Futters von 13,8 kJ/g als moderate Futterlimitierung bezeichnen. Als eine mögliche Ursache für diese deutlich höhere verabreichte Futtermenge ist die Verwendung einer um 4°C niedrigeren  $T_a$  allein nicht ausreichend. Die bei 30°C von Williams et al. (2002) für die Kontrolltiere angegebene Futtermenge von ca. 4,7 g liegt jedoch sowohl im Vergleich zu einer von Wildtyp-Mäusen unter thermoneutralen Bedingungen (35°C) aufgenommenen Futtermenge von 2,8 g (Melnik und Himms-Hagen 1998) als auch zu der in der vorliegenden Studie bei 34°C ermittelten Futteraufnahme von ca. 1,8 g, unverhältnismäßig hoch und entspricht eher den bei normalen Haltungstemperaturen ermittelten Werten anderer Studien (Blackwell et al. 1995, Masuzaki et al. 1999), was auf die Existenz von methodischen Problemen hindeutet. Diese könnten unter Umständen in einer fehlerhaften Registrierung der täglichen Futteraufnahme aufgrund eines Substanzverlustes liegen. Weiterhin kann die Verwendung von männlichen Tieren durch die geschlechtsspezifisch größere Körpermasse eine höhere Futteraufnahme zur Folge haben, allerdings bei Tieren mit einer Körpermasse von ca. 29 g kaum in dem angegebenen Ausmaß. Hinweise auf individuelle und gruppenspezifische Unterschiede in Gewicht und Futteraufnahme, die im Rahmen der vorliegenden Studie bei Tieren gleichen Alters und Geschlechts gefunden wurden, unterstreichen die Komplexität der Frage nach einer geeigneten limitierten Futtermenge.

Eigene Befunde bei weiblichen, 15-23 Wochen alten C57Bl/6J-Mäusen konnten aufgrund eines signifikanten Anstieges des Tagesminimums der MR eine  $T_a$  zwischen 30 und 32°C als UKT für die Tiere mit limitiertem Futterzugang festlegen. Da sich anhand der zur Verfügung stehenden Parameter jedoch kein Hinweis auf das Erreichen der OKT innerhalb des untersuchten  $T_a$ -Bereiches ergab, wurde bei nachfolgenden Untersuchungen 34°C als thermoneutraler Wert verwendet als die höchste  $T_a$ , bei der sich sowohl bei *ad libitum* als auch bei limitiert gefütterten Tieren noch keine Hinweise auf Hitzestress ergeben.

## 4.2 METHODISCHE ÜBERLEGUNGEN ZU DEN IN DEN VERSUCHSREIHEN VERWENDETEN EXPERIMENTELLEN ANSÄTZEN

### 4.2.1 Definition und methodische Ansätze für die Futterlimitierung

Da Nahrungsknappheit zu den natürlichen Lebensbedingungen von Tieren gehört und eine daraus resultierende vorübergehend negative Energiebilanz einen relevanten Faktor für die Modifikation von Leptineffekten darstellen könnte, berücksichtigt die vorliegende Studie bei Langzeit-Leptinbehandlungen neben der *ad libitum* Fütterung auch den limitierten Futterzugang. Die Interpretation des Begriffs „limitierter Futterzugang“ fällt in vorhergehenden Studien äußerst unterschiedlich aus, da einheitliche Beurteilungskriterien für eine angemessene Reduktion der Futtermenge fehlen.

Ein möglicher Ansatz bestand in vielen Untersuchungen darin, dass C57Bl/6-Mäuse mit limitiertem Futterzugang lediglich einen willkürlich festgelegten Prozentsatz von 60-70% der Futtermenge ihrer *ad libitum* gefütterten Kontrolltiere erhalten (Guenounou et al. 1978, Goodrick und Nelson 1989, Blackwell et al. 1995, Masuzaki et al. 1999, Yamamoto et al. 2000). Die Körpermasse der Tiere als beeinflusste Größe bleibt dabei unberücksichtigt. Im Gegensatz dazu steht bei Cabib und Bonaventura (1996) im Rahmen von verhaltensphysiologischen Untersuchungen an C57Bl/6-Mäusen als Kriterium nicht die verabreichte Futtermenge, sondern eine im Vergleich zu den *ad libitum* gefütterten Tieren geringere Körpermasse (ca. 15%) im Vordergrund. Dabei wird die den Tieren zugeteilte Futtermenge jedoch nicht angegeben. Einer von den vorherigen Befunden deutlich abweichende Interpretation des Begriffs der Futterlimitierung folgen Nelson et al. (1985) mit einem bei Mäusen angewandten Fütterungsschema, bei dem kontinuierlich auf den 24-stündigen

Zugang zu einer unbegrenzten Futtermenge eine 24-stündige Fastenperiode folgt, wobei sich die Körpermasse der Tiere mit limitiertem Futterzugang im Vergleich zu ihren *ad libitum* gefütterten Kontrolltieren um 20% reduziert. Ein ähnlicher Ansatz wird in einer Studie an C57Bl/6-Mäusen verwendet, wobei den Tieren hier täglich nur 4 Stunden Zugang zu einer unbegrenzten Futtermenge in ihrer circadianen Ruheperiode gewährt wird (Ahima et al. 1998). Da jedoch in der letztgenannten Untersuchung die Futterraufnahme der Tiere nach anfänglicher Reduktion sogar über der ihrer *ad libitum* gefütterten Kontrolltiere liegt, wird die Problematik der Bezeichnung „limitierter Futterzugang“ hier besonders deutlich.

In der vorliegenden Studie ergeben sich die Bewertungskriterien für die Verabreichung einer angemessenen Futtermenge bei Thermoneutralität durch eine Kombination und Modifizierung der zuvor erwähnten Kriterien. Und zwar wurden sowohl eine im Vergleich zu den Kontrolltieren reduzierte Futtermenge (-30%), wie deren vollständige Aufnahme und das Erreichen einer für adulte Mäuse im unteren physiologischen Grenzbereich liegenden konstanten Körpermasse als Kriterien verwandt. Die eigenen Untersuchungen führten auf diese Weise zu einer Körpermasse der limitiert gefütterten Tiere, die ca. 20% unter der *ad libitum* gefütterter Tiere lag. Die in der vorliegenden Studie verwendete prozentuale Futterreduktion auf ca. 70% der von den zugehörigen Kontrolltieren aufgenommenen Menge stimmt gut mit bisherigen Literaturbefunde bei adulten C57Bl/6-Mäusen bei den üblichen Haltungstemperaturen von 22-25°C überein (Goodrick und Nelson 1989, Blackwell et al. 1995, Masuzaki et al. 1999, Yamamoto et al. 2000). Zudem wurden auch bei einer, laut Angaben der Autoren unter thermoneutralen Bedingungen (30°C) durchgeführten Studie (Williams et al. 2002), in der die Tiere mit limitiertem Futterzugang 60% der Futtermenge ihrer Kontrolltiere erhielten, ähnliche Kriterien verwendet. Ein direkter Vergleich der Absolutwerte der Futterraufnahme zwischen den eigenen Befunden (1,3 g) und den bei üblichen Haltungstemperaturen ermittelten Werten zwischen 2 und 3 g ist jedoch aufgrund des mit steigender  $T_a$  sinkenden Futterbedarfes (Bouali et al. 1995, Melnyk und Himms-Hagen 1998) nicht aussagekräftig. Weiterhin ist zu beachten, dass bei den als Vergleichswerte für die vorliegende Studie verwendeten Daten von BalbC-Mäusen bei normalen Haltungstemperaturen (Döring 2000) die verabreichte Futtermenge der limitiert gefütterten Tiere nur auf ca. 85% der *ad libitum* gefütterten Gruppe beschränkt wurde. Unter diesen Bedingungen wurde dabei mit -15% eine ähnlich starke Reduktion der Körpermasse beobachtet wie in der vorliegenden Studie.

Allerdings beträgt die absolute Futterreduktion im Vergleich zu der *ad libitum* gefütterten Gruppe bei den BalbC-Mäusen mit limitiertem Futterzugang bei normalen Haltungstemperaturen ca. 6,5 kJ/d, während diese in der vorliegenden Studie aufgrund des unter thermoneutralen Bedingungen niedrigen Ausgangswertes nur einen Wert von ca. 5,5 kJ/d erreicht. Die Variabilität in den Festlegungskriterien für das Ausmaß der Futterlimitierung bei den verschiedenen  $T_a$ , die bisher untersucht wurden, sowie eventuell auftretende Unterschiede zwischen den verwendeten Tierstämmen lassen allerdings weitere Untersuchungen wünschenswert erscheinen.

#### 4.2.2 Wahl von Applikationsart und Dosierung bei der Leptinbehandlung

Die in der vorliegenden Untersuchung verwendete Leptinapplikation, bei der die Tiere zweimal täglich subkutan behandelt wurden, wurde zum direkten Vergleich der eigenen Befunde mit Ergebnissen aus vorherigen Untersuchungen gewählt, in denen ebenfalls periphere Leptingaben als Bolus erfolgten (Van Heek et al. 1997, Halaas 1997, Döring 2000, Lin et al. 2000). Die Wahl der subkutanen Applikation erfolgte aufgrund einer wesentlich geringeren Stress-Belastung der Tiere bei gleicher Effizienz im Vergleich zu intravenösen (i.v.) oder i.p. Injektionen (Döring 2000). Allerdings erlauben Bolusinjektionen im Gegensatz zu osmotischen Mini-Pumpen, die eine kontinuierliche Veränderung des Plasmaleptinspiegels bewirken, keine sinnvollen Aussagen über wirksame Leptinspiegel, so dass die Wahl einer auf zwei Einzelinjektionen verteilten Tagesdosis von  $200 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , die sowohl für die ein- als auch für die zehntägigen Leptinbehandlungen verwendet wurde, auf den Ergebnissen einer vorhergehenden Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung während Kurz- und Langzeit-Leptinbehandlungen (Döring et al. 1998) basiert. Innerhalb dieser Studie wurde bereits bei einer einmaligen Dosis von  $20 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  eine signifikante Reduktion der Futteraufnahme bei Wildtyp-Mäusen verzeichnet, durch eine Verteilung der Tagesdosis auf zwei Einzelinjektionen pro Tag kam es bei allen untersuchten Dosierungen zu einer Effektivitätssteigerung der Leptinwirkung (Pelleymounter et al. 1995, Döring 2000). Da sich in der Literatur angegebene, bereits im pharmakologischen Bereich liegende Dosierungen bei Mäusen zwischen 120 und  $600 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (Lin et al. 2000, Van Heek et al. 1997) auch bei Zugang zu hochkalorischer Zusatznahrung als wirksam erwiesen, kann die gewählten Dosis von  $200 \text{ pmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  als ausreichend wirksam eingestuft werden, zumal durch die Verteilung

der Dosis auf zwei Einzelinjektionen von einer Steigerung der Leptinwirksamkeit auszugehen ist.

#### 4.2.3 Beurteilung des Leptineffekts

Die Beurteilung des Leptineffekts erfolgt in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer unter Verwendung zweier verschiedener Auswertungsverfahren. Dabei wurde bei eintägigen Behandlungen unter *ad libitum* Fütterung, bei denen kein messbarer Effekt auf die Körpermasse zu erwarten ist, der Leptineffekt anhand der Futterraufnahme bewertet. Zu diesem Zweck wurde der Futterwert eines jeden behandelten Tieres am Effekttag unter Berücksichtigung von bereits bestehenden Unterschieden aus dem eigenen jeweils zweitägigen Vor- und Nachlauf korrigiert und als Differenz zum Mittelwert der Kontrolltiere ausgedrückt. Dieses Auswertungsschema setzt ein Auftreten der anorektischen Leptinwirkung innerhalb von 24 Stunden, also an dem der Injektion folgenden Effekttag, voraus, wie in einer vorhergehenden Untersuchung mit dieser Dosierung gezeigt wurde (Döring 2000). Anhand der von Döring (2000) durchgeführten Studie konnte weiterhin ein kompensatorischer Anstieg der Futterraufnahme im Nachlauf ausgeschlossen werden.

Die quantitative Beurteilung der Leptinwirkung bei einer 10-tägigen Behandlung während *ad libitum* und limitierter Fütterung erfolgte, um dem energetischen Aspekt einer Langzeit-Leptinbehandlung Rechnung zu tragen, anhand von Unterschieden in der Körperfettmasse zwischen behandelten und Kontrolltieren, die sowohl auf Veränderungen im zeitlichen Mittels der Futterraufnahme als auch der ADMR basieren. In dem 10-tägigen Behandlungszeitraum kommt es dabei zu einer Addition von kleinen, nicht signifikanten Veränderungen in diesen Effektorsystemen (Eiden et al. 2000), die sich letztendlich auf den Körperfettgehalt auswirken. Eine Besonderheit stellt eine 10-tägige Leptinbehandlung während hochkalorischer Zusatzfütterung bei Versuchsgruppe G dar, bei der aufgrund des relativ hohen Tieralters in Kombination mit der diätetischen Vorgeschichte der Tiere auf eine Auswertung der quantitativen Leptinwirkung anhand von Veränderungen der Körperzusammensetzung verzichtet wurde. In diesem Fall wurde die mittlere Abweichung der Futterraufnahme vom Mittelwert der Kontrolltiere als Maß für die Leptinwirkung verwendet, wobei sowohl die Gesamtenergieaufnahme als auch die Aufnahme der verschiedenen Futtersorten separat analysiert wurden. Die Verwendung der Körpermasse als eine leicht messbarer Größe ist insofern problematisch, da es ausschließlich bei *ad libitum*

gefütterten Mäusen zu einem nachweisbaren Leptineffekt auf diesen Parameter kommt (vgl. 4.2.1).

#### 4.2.4 Problematik der Versuchsgruppen-spezifischen Unterschiede

Das in 2.7.2 beschriebene Auswertungsschema ermöglicht aufgrund der Normierung von individuellen Ergebnissen durch die von den jeweiligen Kontrolltieren aufgenommenen Futtermenge und das Einbeziehen von Vor- und Nachlauf sowohl den gruppeninternen als auch den gruppenübergreifenden Vergleich von Ergebnissen eintägiger Leptinbehandlungen. Durch Differenzbildung zum Mittelwert der Kontrolltiere wurden ebenso bei den 10-tägigen Leptinbehandlungen anfängliche Gruppenunterschiede in der Körperzusammensetzung relativiert. Diese Vorgehensweise war vor allem von Belang, da die aus einer externen Zucht stammenden verwendeten Tiere bereits im Rahmen von Vorversuchen deutliche Unterschiede in der Körperfettmasse von bis zu 1,5 g bei einer mittleren Absolutfettmasse von ca. 2,3 g zeigten (I. Schmidt, unveröffentlichte Ergebnisse). Dieser Befund initiierte die Verwendung von Wurfgeschwistern zur Steigerung der Homogenität der gruppeninternen Ausgangsbedingungen, die jedoch in der vorliegenden Studie zu einem relativ späten Zeitpunkt und somit ausschließlich bei zwei Versuchsgruppen zum Einsatz kam. Gleichzeitig erfolgte aufgrund des Auftretens von starken gruppenspezifischen Schwankungen der Ausgangsbedingungen die quantitative Auswertung von Absolutwerten innerhalb einer Versuchsreihe ausschließlich unter Einbeziehen des Faktors Versuchsgruppe, so dass ein statistischer Vergleich zwischen Tieren der *ad libitum* und der limitiert gefütterten Versuchsreihe nicht möglich war.

Da in einer parallel angefertigten Diplomarbeit<sup>7</sup> ein bisher nur bei Ratten nachgewiesener Verlust der Leptinresponsivität in Zusammenhang mit einem Körpermassenanstieg ab einem gewissen Alter (Shek und Scarpace 2000, Scarpace und Tümer 2001) auch bei C57Bl/6J-Mäusen im Alter von etwa 30 Wochen beobachtet wurde, beschränkt sich die Auswertung der Leptinresponsivität und des Körpermassenverlaufes zur Vermeidung von Überlagerungen verschiedener Faktoren auf ein Tieralter bis zu 27 Wochen.

---

<sup>7</sup> Quelle: Diplomarbeit C.Daniel, Fachbereich Haushalts- und Ernährungswissenschaften, Universität Gießen, 2002

### **4.3 AUSWIRKUNGEN EINER THERMONEUTRALEN UMGEBUNGSTEMPERATUR AUF LANGZEIT-LEPTINEFFEKTE BEI *AD LIBITUM* ODER LIMITIERTER FÜTTERUNG**

#### **4.3.1 Die Körperfettmasse als Maß für die Leptinwirkung**

In der Literatur werden bei Leptinbehandlungen häufig Veränderungen der Körpermasse zur Beurteilung von Leptineffekten herangezogen (Halaas et al. 1997, Pellemounter 1997). Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte zwar prinzipiell gezeigt werden, dass in beiden Fütterungsgruppen analog zur Veränderung der Körpermasse Veränderungen der Feuchtmasse auftraten. Dies zeigt, dass die Modifikation der Körpermasse in einer veränderten Körperzusammensetzung begründet ist und Differenzen aufgrund eines unterschiedlichen Füllungszustandes des Magen-Darm-Traktes in der vorliegenden Untersuchung keine Rolle spielten. Trotzdem muss betont werden, dass sich bei ausschließlicher Betrachtung der Körpermasse nur bei den *ad libitum* gefütterten Mäusen ein Leptineffekt nachweisen ließ, während Mäuse mit limitiertem Futterzugang keinerlei Veränderungen dieses Parameters zeigten, obwohl sie eine deutliche Reduktion der Körperfettmasse aufwiesen. Aufgrund dieser bereits von Döring (2000) bei normalen Haltungstemperaturen angesprochene Problematik ist somit die Verwendung der Körpermasse als ein Maß für die Leptinwirkung nicht verlässlich.

#### **4.3.2 Bestehen temperaturabhängige Unterschiede in der Leptinwirkung auf die Körperzusammensetzung?**

Wird dagegen in Anlehnung an vorhergehende Studien (Pellemounter et al. 1995, Döring et al. 1997, Stehling et al. 1997, Döring 2000, Eiden 2002) die Körperfettmasse als Bezugsgröße für die Leptinwirkung verwendet, zeigt sich in der vorliegenden Untersuchung bei beiden Fütterungsgruppen ein analoger Leptineffekt, da die Körperfettmasse durch die 10-tägige Leptinbehandlung in beiden Fällen um ca. 1 g reduziert wird. Prozentual zu ihrem deutlich geringeren Ausgangswert betrachtet, erscheint diese Fettmassen-Reduktion bei Tieren mit limitiertem Futterzugang jedoch etwas stärker ausgeprägt (-30%) als bei *ad libitum* gefütterten Tieren (-20%). Im Vergleich hierzu ergab sich bei Döring (2000) unter Kältebelastung (24°C) bei beiden Fütterungsbedingungen

eine Reduktion der Körperfettmasse um 45%, wobei sich der deutlich größere prozentuale Wert aus dem geringen Fettgehalt der Tiere bei niedrigerer  $T_a$  erklärt. Beim Vergleich der energetisch relevanten Absolutwerte von 1,2 g vs. 0,8 g ergab sich dagegen bei 24°C ein deutlich höherer Wert für die Fettmassereduktion der *ad libitum* gefütterten Tiere. Zum jetzigen Zeitpunkt kann jedoch weder der prozentualen noch der absoluten Darstellungsform dieser Differenz der Vorzug gegeben werden. Da der in diesen Untersuchungen verwendete Ansatz keine Ermittlung der Signifikanz der Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen erlaubt (vgl. 4.2.4), ist zudem eine Abwägung geringer Unterschiede in den prozentualen Werten schwierig. Die hier vorliegenden Befunde zeigen jedoch klar, dass zumindest bei Futterlimitierung keine gravierenden Unterschiede in der energetisch relevanten Senkung der Körperfettmasse unter thermoneutralen Bedingungen im Vergleich zu den Untersuchungen bei normaler Haltungstemperatur auftreten. Bei den *ad libitum* gefütterten Tieren deutet sich dagegen eine schwächere Reaktion unter thermoneutralen Bedingungen an, wobei aber die Differenz zu der bei Döring (2000) ermittelten Fettmassereduktion von ca. 1,2 g zu gering ist, um angesichts der oben diskutierten Problematik von Versuchsgruppenunterschieden deren Verschiedenheit zu sichern.

Die in der vorliegenden Untersuchung ausschließlich bei den *ad libitum* gefütterten Tieren auftretende Reduktion der FFDM steht im Einklang zu dem bereits in vorhergehenden Studien diskutierten Einfluss der Leptinwirkung auf diesen Parameter (Halaas et al. 1995, Kraeft et al. 1999, Döring 2000, Rafael und Herling 2000, Chen und Heiman 2000, Eiden 2002). In diesem Zusammenhang muss jedoch betont werden, dass in der vorliegenden Arbeit die Beeinflussung der FFDM im Gegensatz zu einem Großteil der Literatur sogar das Signifikanzniveau erreicht. Aufgrund der unter thermoneutralen Bedingungen bereits initial äußerst niedrigen Futteraufnahme wäre es vorstellbar, dass nach der leptin-induzierten Senkung der Futteraufnahme auf extrem niedrige Werte und der daraus resultierenden Reduktion der Körperfettmasse möglicherweise ein Abbau von Proteinen als Kompensationsversuch für den auftretenden Glukosemangel einsetzen könnte. Andererseits muss trotz der festgestellten signifikanten Reduktion der FFDM, als einen potentiellen sekundären Leptineffekt, angesichts der geringen N-Zahl die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Differenz in der FFDM der Behandlungsgruppen lediglich die starken Schwankungen der Ausgangskörperfettmasse und somit auch der Ausgangs-FFDM-Masse bei ausgeglichener Körpermasse reflektieren könnte.

Eine signifikante Erhöhung der Körperwassermasse im Behandlungszeitraum bei Tieren mit limitiertem Futterzugang, die bei Haltungstemperatur eine trotz der Reduktion der Körperfettmasse konstant bleibende Körpermasse bedingt (Döring 2000) und auf einer gesteigerten Wasseraufnahme sowie einer erhöhten Harnretention beruhen könnte (Sivitz et al. 1997), kann in der vorliegenden Studie allerdings nicht bestätigt werden. Jedoch die auch hier nachgewiesene, wenngleich nicht signifikante Erhöhung des Körperwassers der Tiere führt in Übereinstimmung zu den Daten von Döring (2000) dazu, dass es parallel zu der leptininduzierten Reduktion der Körperfettmasse nur zu einer minimalen, nicht signifikanten Abnahme sowohl der Körper- als auch der Feuchtmasse bei Tieren mit limitiertem Futterzugang kommt, ohne dass sich eine Veränderung der FFDM abzeichnet.

#### **4.3.3 Effektorsysteme der Leptinwirkung und deren Modifikation bei Thermoneutralität**

Im Rahmen von Langzeit-Leptinbehandlungen mit pharmakologischen Dosen bei Haltungstemperaturen konnte bisher in Abhängigkeit von den Fütterungsbedingungen sowohl eine Modifikation der Energieaufnahme als auch der Energiedissipation nachgewiesen werden (Döring 2000). Dabei wurde einerseits ein hemmender Leptineffekt auf die Futtermittelaufnahme bei *ad libitum* Fütterung beschrieben (Campfield et al. 1995, Halaas et al. 1995, Pellemounter et al. 1995 & 1997, Döring 2000), andererseits erfolgte bei Tieren mit limitiertem Futterzugang, die aufgrund ihrer Stoffwechselsituation eine torporartige Drosselung der thermoregulatorischen Aktivität während des circadianen Minimums zeigten, die Vermittlung der Leptinwirkung ausschließlich über eine Disinhibierung dieser torporartigen Absenkungen (Stehling et al. 1996, Döring et al. 1998). Die eigenen bei thermoneutralen Bedingungen ermittelten Befunde stützen die Beobachtungen, dass in Abhängigkeit vom Nahrungsangebot verschiedene Effektorsysteme zur Regulierung des Körperfettgehaltes bei Wildtyp-Mäusen aktiviert werden, da auch hier die behandelten *ad libitum* gefütterten Tiere eine signifikante Reduktion ihrer Energieaufnahme zeigen, während bei den behandelten Tieren mit limitiertem Futterzugang ein signifikanter Anstieg der MR im Vergleich zu ihren Kontrolltieren verzeichnet wird. In diesem Zusammenhang muss allerdings nochmals auf die oben diskutierte Problematik der angemessenen und möglichst standardisierten Futterlimitierung bei verschiedenen  $T_a$  hingewiesen werden, die die Voraussetzung für das Eintreten einer Stoffwechselsenkung

bei den limitiert gefütterten Tieren als entscheidende Bedingung für das Sichtbarwerden eines Stoffwechseleffektes darstellt.

#### 4.3.3.1 Veränderung der Futteraufnahme und der Energieabgabe durch Leptinbehandlung bei *ad libitum* gefütterten Tieren unter thermoneutralen Bedingungen

In Anbetracht der von Döring (2000) bei normalen Haltungstemperaturen ermittelten Ergebnisse bei gleicher Leptindosis deuten die Befunde der vorliegenden Untersuchung bei *ad libitum* gefütterten Tieren auf eine Reduzierung des Leptineffektes auf den Körperfettgehalt bei Thermoneutralität hin. Dagegen ist die Senkung der absoluten Futteraufnahme bei beiden  $T_a$  annähernd gleich. Die im Verhältnis zu der drastischen Leptinwirkung auf die Futteraufnahme nur moderate und nicht signifikante Modifikation der Körperfettmasse bei *ad libitum* Fütterung könnte folgende, nicht notwendigerweise alternative Gründe haben: Zum einen könnte es bei der Bestimmung der Futteraufnahme zu einer Verzerrung der tatsächlich aufgenommenen Futtermenge aufgrund eines Substanzverlustes durch Krümeln gekommen sein. Dabei können sowohl Unterschiede im durchschnittlichen Fressverhalten einzelner Versuchsgruppen als auch eine Erhöhung des Substanzverlustes aufgrund von wachsendem Hitzestress mit ansteigender  $T_a$  eine mögliche Fehlerquelle für die Bestimmung der  $T_a$ -abhängigen Futteraufnahme darstellen. Zur zukünftigen Eliminierung dieser möglichen Fehlerquelle wurden in 2.6.1 beschriebene Futterhalter entwickelt, die jedoch erst in nachfolgenden Versuchsreihen verwendet wurden. Zum anderen zeigte sich bei den aus externer Zucht stammenden Versuchstieren bereits in Vorversuchen eine erhebliche Variabilität in der Körperfettmasse. Aufgrund dessen muss bei der Auswertung dieser Bezugsgröße berücksichtigt werden, dass innerhalb der verwendeten Versuchsgruppe nicht zwangsläufig von einer gleichen Ausgangsfettmasse ausgegangen werden kann. Somit könnte eine nicht signifikante Reduktion der Körperfettmasse in der großen Streuung der Ausgangsfettmasse der Einzeltiere begründet sein.

Weiterhin stellt die leichte Absenkung der MR bei den behandelten *ad libitum* gefütterten Tieren einen Nebeneffekt der gedrosselten Futteraufnahme dar, die vermutlich auf einer verminderten obligatorischen diät-induzierten Thermogenese beruht (Girardier und Stock 1983). Dieser Befund unterstreicht, dass es nicht zu einer leptinbedingten Steigerung der sympathisch vermittelten Thermogenese über den Normalwert kommt (Schmidt et al. 1997, Döring 2000), sondern der energetisch relevante Gesamtenergieumsatz der

behandelten *ad libitum* gefütterten Tiere sogar eine leichte Reduktion aufweist, also energetisch nicht zu der beobachteten Absenkung der Körperfettmasse beitragen kann. Dies deckt sich auch mit Befunden von Döring (2000) bei *ad libitum* gefütterten Tieren bei 24°C.

#### 4.3.3.2 Das Auftreten torporartiger Zustände bei Nagern und ihre Beeinflussung durch Leptin in Abhängigkeit von $T_a$ und Futtermenge

Die hier bei limitierter Fütterung ermittelte signifikante Reduktion der Körperfettmasse bei mit Leptin behandelten Tieren basiert analog zu den von Döring et al. (1998) bei normaler Haltungstemperatur durchgeführten Untersuchungen ausschließlich auf einer Anhebung der MR auf Normalniveau, ohne dass dabei der durchschnittlich von *ad libitum* gefütterten Kontrolltieren erreichte Wert überschritten wurde. Weiterhin zeigen vorhergehende Studien, dass der Aufenthalt in einer thermoneutralen Umgebung bei jungen Ratten, jedoch nicht bei sibirischen Hamstern oder Marsupaliern von ähnlicher Körpergröße (*Sminthopsis macroura*), das Auftreten von torporartigen Zuständen verhindert (Heldmaier et al. 1981, Heldmaier et al. 1982, Nüsslein-Hildesheim und Schmidt 1994, Schmidt et al. 1997, Song et al. 1998). Das Auftreten von torporartigen Zuständen, obwohl sich der energetische Aufwand zur Kälteabwehr unter thermoneutralen Bedingungen auf einem minimalen Niveau befindet, deutet darauf hin, dass diese nicht nur auf einer Reduktion der thermoregulatorischen Aktivität beruhen. So konnte bei sibirischen Hamstern nachgewiesen werden, dass eine geringe Tageslänge (=Kurztag) selbst bei thermoneutralen  $T_a$  Torpor auslöst, während dieser bei einer Lichtphase von 16 Stunden (=Langtag) nicht auftritt (Heldmaier et al. 1999). Energetische Kalkulationen basierend auf Untersuchungen der Körperzusammensetzung von Kurztag-Hamstern nach einer 10-tägigen Behandlung mit Leptin wiesen erstmals darauf hin, dass auch unter thermoneutralen Bedingungen eine Leptin-induzierte Stoffwechselfdisinhibierung auftreten könnte (Klingenspor et al. 2000). Allerdings muss dazu ergänzend erwähnt werden, dass es bei Untersuchungen an Hamstern, die unter ähnlichen Bedingungen nur 3 Tage lang mit Leptin behandelt wurden, zunächst anhand der  $T_c$  keinerlei Hinweise auf eine Verringerung der torporartigen Absenkungen der Stoffwechselrate gab (Schmidt et al. 1997).

Im Gegensatz sowohl zu den eigenen Ergebnissen wie den Befunden von Klingenspor et al. (2000) bei Hamstern stellten Stehling et al. (1997) im Rahmen von Langzeitbehandlungen bei juvenilen Ratten mit experimentell gleichhaltener Nahrungsaufnahme bei Thermoneutralität einen Verlust der bei normalen Haltungstemperaturen auftretenden Leptinwirkung fest. Juvenile Ratten zeigen jedoch torporartige Absenkungen der MR und  $T_c$  bei Kältebelastung auch bei normalen Fütterungsbedingungen (Stehling et al 1996). Eine Untersuchung an juvenilen Ratten stellt somit nur einen inadäquaten Vergleich mit den eigenen Befunden dar, da bei Mäusen das Auftreten von torporartigen Zuständen ausschließlich bei limitiertem Futterzugang unter moderater Kältebelastung beobachtet wurde (Hudson und Scott 1979, Döring et al. 1997), während diese bei thermoneutraler  $T_a$  trotz limitiertem Futterzugang nicht auftraten (Williams 2002). Bei der in der vorliegenden Untersuchung unter thermoneutralen Bedingungen im Tagesmittel auftretenden Reduktion der Stoffwechselrate bei Tieren mit limitiertem Futterzugang im Vergleich zu den *ad libitum* gefütterten Kontrolltieren ergab die Betrachtung des circadianen Verlaufes der MR ebenfalls keinerlei Hinweise auf das Auftreten von torporartigen Stoffwechselabsenkungen in den Ruheperioden. Dies wird dadurch unterstrichen, dass trotz der generell niedrigeren MR unter thermoneutralen Bedingungen praktisch keine Werte unter 5 W/kg auftraten, während in den Untersuchungen bei 24°C ca. 10% der Werte der unbehandelten Tiere mit limitiertem Futterzugang diesen Wert unterschritten.

In Übereinstimmung mit dem von Döring (2000) bei normalen Haltungstemperaturen gezeigten Tagesgang ergab sich dagegen bei den unbehandelten Tieren mit limitiertem Futterzugang ein sehr steiler Abfall der MR nach dem Tagesmaximum. Die in den eigenen Befunden gezeigte leichte, jedoch signifikante Erhöhung der mittleren MR bei den mit Leptin behandelten, limitiert gefütterten Tieren stellt zunächst einen unter thermoneutralen Bedingungen bei Mäusen unerwarteten Befund dar. Wie durch die Analyse der Häufigkeitsverteilung gezeigt, beruht diese auf einer Verschiebung der MR aus dem Bereich niedriger in den Bereich mittlerer Stoffwechselraten, während – wie bei Döring – die Werte im Bereich der höheren Stoffwechselraten unbeeinflusst bleiben. Die vorliegenden Befunde weisen somit auf die Möglichkeit hin, dass Leptin auch unter thermoneutralen Bedingungen und in Abwesenheit torporartiger Zustände der mit einer Nahrungslimitierung einhergehenden Stoffwechselsenkung entgegenwirken kann, ein im Hinblick auf die menschlichen Lebensbedingungen sehr wichtiger Hinweis. Da in der Literatur bisher keine weiteren Untersuchungen von Leptinbehandlungen bei limitiert gefütterten adulten

Mäusen unter thermoneutralen Bedingungen vorliegen, die eigenen Ergebnisse der limitiert gefütterten Tiere jedoch nur auf einer geringen Tierzahl basieren, ist zur Absicherung dieses interessanten Erstbefundes jedoch eine Wiederholung der durchgeführten Untersuchungen zur Vergrößerung der N-Zahl wünschenswert.

#### **4.4 AUSWIRKUNGEN EINES PERIODISCHEN ZUGANGS ZU SENSORISCH ATTRAKTIVER, HOCHKALORISCHER ZUSATZNAHRUNG**

Neben dem Einfluss thermoneutraler  $T_a$  stellt der optionale Zugang zu hochkalorischer, fettreicher, sensorisch attraktiver Nahrung einen weiteren wichtigen Faktor für das Auftreten von Adipositas in den westlichen Industrieländern dar. Während sich in Literaturbefunden bereits mehrfach das Entstehen von Adipositas aufgrund eines kontinuierlichen Angebotes hochkalorischer fettreicher Nahrung in Tiermodellen bestätigt hat (Hill et al. 1992, Widdowson et al. 1997, Halaas et al. 1997, Lin und Huang 1999, Lin et al. 2000), beschäftigt sich die vorliegende Studie weiterführend mit dem Einfluss der „diätetischen Vorgeschichte“ auf die Entwicklung einer diätinduzierten Adipositas und einer damit verbundenen funktionellen Leptinresistenz während eines periodischen Wechsels des Nahrungsangebotes. Dabei wird vor allem der Gesamtdauer der hochkalorischen Zusatznahrung sowie dem Zeitmuster des Nahrungsangebotes in Bezug auf die Modifikation der Leptinresponsivität und die Veränderung der Körpermasse besondere Bedeutung beigemessen.

##### **4.4.1 Diätinduzierte Adipositas**

###### **4.4.1.1 Adipositas als Folge eines periodischen Zugangs zu hochkalorischem Futter**

Eigene Befunde weisen darauf hin, dass die Entstehung einer diätinduzierten Adipositas nicht zwangsläufig an den permanenten Zugang zu hochkalorischer Nahrung gebunden ist (Halaas et al. 1997, Van Heek et al. 1997, Lin und Huang 1999, Lin et al. 2000), sondern dass auch ein periodischer Wechsel zwischen weniger energiereichem Standardfutter und energiedichtem Zusatzfutter einen deutlichen Zuwachs der Körpermasse mit starker Streuung der Einzeltierwerte hervorruft (siehe Abb. 15). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass es trotz einer akuten Reduktion der Körpermasse in Perioden mit ausschließlicher

Verabreichung eines Standardfutters zu einem kontinuierlichen Körpermasse-Zuwachs mit steigender Versuchsdauer kommt, der jedoch schwächer ist als bei permanenten Zugang zu hochkalorischer Nahrung, wie in einer parallel durchgeführten Diplomarbeit<sup>8</sup> gezeigt wurde.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Untersuchung bei Tieren, die über einen Gesamtzeitraum von mindestens 140 Tagen periodisch bis zu jeweils 23 Tagen pro Zyklus Zugang zu Zusatzfutter hatten, ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Körpermasse vor Beginn der ersten Zusatzfütterungsphase und der zu Versuchsende bestimmten Körpermasse nachgewiesen werden (siehe Abb. 16). Diese Korrelation weist auf einen Zusammenhang zwischen der Körpermasse vor Beginn der ersten Zusatzfütterungsphase und der Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas im Alter hin. Dabei muss betont werden, dass zur Erhöhung der N-Zahl auch auf Tiere zurückgegriffen wurde, die das zuvor festgelegte Höchstalter von 27 Wochen deutlich überschritten. Die enge Korrelation zwischen den beiden Körpermasse-Werten trotz einer möglichen altersbedingten Leptinresistenz unterstreicht somit indirekt den starken Einfluss der Ausgangskörpermasse.

Im Rahmen dieser Untersuchungen ist die Verwendung der Körpermasse als Bezugsgröße für den Ausprägungsgrad von Adipositas in der vorliegenden Untersuchung insofern gerechtfertigt, als dass die enge Korrelation zwischen Körpermasse und Körperfettmasse bzw. Körperfettgehalt bei Tieren mit periodischem Zugang zu Zusatzfutter bereits nachgewiesen wurde, während bei Tieren mit ausschließlicher Fütterung von Standardfutter diese nicht korrelieren<sup>9</sup>. Der in der vorliegenden Untersuchung beobachtete Anstieg der Körpermasse in Perioden mit Zusatzfütterung erfolgt analog zu den von Hill et al. (1992) ermittelten Ergebnissen aufgrund einer Hyperphagie-bedingten positiven Energiebilanz, die jedoch nicht durch eine Steigerung der zuvor aufgenommenen absoluten Nahrungsmenge zustande kommt, sondern vielmehr durch eine Verschiebung der Anteile der aufgenommenen Futtersorten zugunsten des fettreichen Zusatzfutters, welches über eine vergleichsweise hohe Energiedichte verfügt. Eigene Befunde, in denen der Anteil an Standardfutter während des Zugangs zu Zusatzfutter auf unter 5% sinkt, bestätigen diese Ergebnisse. Ursächlich für diesen Befund scheint eine im Vergleich zu Kohlenhydraten verminderte Sättigungsfunktion und erhöhte Schmackhaftigkeit von Fetten (Blundell und

---

<sup>8</sup> Quelle: Diplomarbeit C. Daniel, Fachbereich Haushalts- und Ernährungswissenschaften, Universität Gießen, 2002

<sup>9</sup> Quelle: Diplomarbeit C. Schubert, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg, 2002

Tremblay 1985) zu sein, verbunden mit einer bei den zur Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas neigenden C57Bl/6J-Mäusen (West et al. 1992) nachgewiesene Makronährstoffpräferenz für Fett (Smith et al. 1999; Smith et al. 2000). Weiterhin ist für die Ausprägung von Adipositas förderlich, dass ein erhöhter Fettkonsum nicht mit einer unmittelbaren Steigerung der Fettoxidation einhergeht (Schutz et al. 1989), während es beim gesteigerten Konsum von Kohlenhydraten und Proteinen zu einer erhöhten Oxidation dieser Nährstoffe kommt (Flatt et al. 1985).

#### 4.4.1.2 Variabilität im Ausprägungsgrad der diätinduzierten Adipositas

Der in der vorliegenden Untersuchung generell auftretende Körpermassenanstieg ist vor allem in Perioden mit Zusatzfütterung durch eine große Variabilität der Einzeltierwerte gekennzeichnet, die auf das individuelle Ansprechen auf die Adipositas fördernde Faktoren hinweist. Diesbezüglich ist zu erwähnen, dass in der Sensibilität zur Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas bereits seit längerem stark ausgeprägte Unterschiede zwischen verschiedenen Nagetierstämmen bekannt sind (Black et al. 1998, Surwit et al. 1997, Surwit et al. 2000, Watson et al. 2000).

In diesem Zusammenhang zeigte sich bei einem stammesübergreifenden Vergleich des C57Bl/6J-Stammes mit A/J-Mäusen, bei denen die Neigung zu einer diätinduzierten Adipositas weitaus geringer ausgeprägt ist (Black et al. 1998), die Verknüpfung eines rasch ansteigenden Plasmaleptinspiegels mit einer weniger starken Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas. Nach 4-wöchigem Angebot einer hochkalorischen, fettreichen Diät trat zwischen den beiden untersuchten Stämmen ein signifikanter Unterschied im Plasmaleptinspiegel auf, wobei der des A/J-Stammes signifikant höher lag als der des C57Bl/6J-Stammes (Surwit et al. 1997, Surwit et al. 2000, Watson et al. 2000). Somit deutet sich an, dass die Fähigkeit, auf ein fettreiches Nahrungsangebot mit einer raschen und ausgeprägten Erhöhung des Plasmaleptinspiegels zu reagieren, ein wichtiges Kriterium für die spätere Resistenz gegenüber der Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas darstellt (Lin et al. 1998).

Zusätzlich konnten jedoch auch individuelle Unterschiede zwischen Tieren eines Inzuchtstammes in der Neigung zur Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas mehrfach beobachtet werden, auch wenn gerade bei Inzuchtstämmen eine genetische Variabilität nahezu ausgeschlossen ist. So zeigen Wistar-Ratten, die nach einer Woche Zugang zu

hochkalorischer Nahrung über einen verhältnismäßig hohen Plasmaleptinspiegel verfügen, eine reduzierte Futterraufnahme und eine weitaus geringere Neigung für die Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas als Tiere, deren Plasmaleptinspiegel in dem gleichen Zeitraum weniger stark angestiegen war (Harrold et al. 2000). Gleichzeitig konnte bei diesen Tieren eine negative Korrelation zwischen der Höhe des Plasmaleptinspiegels und der MC4-Rezeptordichte im ventromedialen Hypothalamus festgestellt werden. Dieser Befund wird von den Autoren als eine mögliche unterschiedliche Fähigkeit zur MC4-Rezeptordichte-Erhöhung im ventromedialen Hypothalamus interpretiert, der einen der wichtigsten Wirkungsorte einer frühen Leptinreaktion darstellt (Harrold et al. 2000).

Analog zu vorhergehenden Untersuchungen deuten die Befunde der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass auch bei isogenen Tieren (Beck et al. 2000), d.h. bei Tieren eines Inzuchtstammes, die folglich genetisch weitgehend identisch sind, die Neigung zur Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas deutliche Unterschiede aufweist. Als mögliche Ursache für diese Beobachtung kommen epigenetische Faktoren (Dörner und Plagemann 1994, Levin 2000, Schmidt 2002) in Betracht, d.h., Faktoren, die aufgrund individueller Unterschiede in Bezug auf in früheren Entwicklungsstadien erfahrenen Umwelteinflüsse zu permanenten physiologischen Änderungen führen, die in Verbindung mit genetischen Voraussetzungen eine unterschiedliche Neigung zur Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas bedingen können.

Neben den erwähnten Unterschieden im Plasmaleptinspiegel wurden innerhalb des C57Bl/6J-Mäusestammes bereits bei A/J-Mäusen beschriebene Veränderungen in der hypothalamischen Genexpression als Kompensationsmechanismus zur Vermeidung einer diätinduzierter Adipositas (Bergen et al. 1999) jedoch ausschließlich in einem sehr kurzen Zeitraum von zwei Tagen mit Zugang zu hochkalorischer Nahrung nachgewiesen (Bergen et al. 1999, Ziotopoulou et al. 2000). Dabei handelt es sich um ein Absinken der NPY-mRNA-Spiegel, sowie einen Anstieg der POMC-mRNA-Spiegel in Korrelation mit einer Erhöhung der Körpermasse (Bergen et al. 1999). Ob individuellen Unterschieden innerhalb eines Inzuchtstammes ähnliche Kompensationsmechanismen zugrunde liegen, ist jedoch noch nicht geklärt.

#### 4.4.2 Veränderungen der Leptinresponsivität bei periodischem Wechsel des Nahrungsangebotes unter Berücksichtigung von Körpermasseänderungen

Die vorliegenden Befunde weisen darauf hin, dass die Leptinresponsivität ebenso wie die Körpermasse bei periodischem Zugang zu hochkalorischer Nahrung sowohl von der Dauer der akuten Fütterungsperiode als auch von der Gesamtdauer des Angebotes eines Zusatzfutters beeinflusst werden. Dagegen wird die Beziehung zwischen Körpermasse und Futteraufnahme sowie zwischen Körpermasse und Leptinresponsivität durch die Gesamtdauer der hochkalorischen Zusatzfütterung nicht beeinflusst.

##### 4.4.2.1 Erstmöglicher Zugang zu Zusatzfutter

Untersuchungen an Tieren, die zum ersten Mal Zugang zu Zusatzfutter hatten, zeigen eine nur langsame Abnahme der Leptinresponsivität, die zudem nach Rückkehr zu Standardfutter rasch wiederkehrt (siehe Abb. 18 oben). Parallel dazu kommt es mit Beginn der Zusatzfütterung zu einem nur geringen, aber signifikanten Anstieg der Körpermasse, der allerdings nach Umstellung auf Standardfutter zumindest innerhalb von 7 Tagen beibehalten wird (siehe Abb. 19 oben). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass bei erstmaligem optionalen Zugang zu fett- und kohlenhydratreicher Nahrung eine Erhöhung der Körpermasse nicht die alleinige Ursache für eine Reduktion der Leptinresponsivität darstellt. Als eine weitere mögliche Einflussgröße kommt weiterhin die Höhe des endogenen Plasmaleptinspiegels in Betracht, wobei dieser zwar langfristig bei Tieren mit hochkalorischer Ernährung eine gute Korrelation mit der Körpermasse aufweist, kurzfristige Abweichungen jedoch durchaus möglich sind<sup>10</sup>. Auch Cooling et al. wiesen 1998 bei Menschen nach, dass ein akuter Konsum von fettreicher Nahrung zu einer Steigerung der Leptinsekretion führte, ohne dass parallel dazu eine Erhöhung des BMI auftrat. Vorhergehende Untersuchungen, in denen es bereits innerhalb von zwei Tagen mit Zugang zu hochkalorischer Nahrung zu einem Anstieg des Plasmaleptinspiegels (Lin et al. 1998, Ziotopoulou et al. 2000) kam, unterstreichen die Möglichkeit einer raschen, Fettmasse-unabhängigen Änderung des Plasmaleptinspiegels als Reaktion auf das akute Nahrungsangebot. Ferner besteht aufgrund der positiven Beeinflussung des Plasmaleptinspiegels durch den endogenen Insulinspiegel (Saladin et al. 1995, Sinha et al. 1996) die

---

<sup>10</sup> Quelle: Diplomarbeit C. Daniel, Fachbereich Haushalts- und Ernährungswissenschaften, Universität Gießen, 2002

Möglichkeit, dass eine bei fettreicher Nahrung erhöhte Insulinsekretion einen Anstieg des Plasmaleptinspiegels nach sich zieht (Harte et al. 1999). Eine nachfolgende Reduktion des Nahrungsfettes führt wieder zu einer Normalisierung des Plasmainsulinspiegels (Parekh et al. 1998) sowie der Körpermasse. Unter diesem Gesichtspunkt weisen auch Lin et al. (2001) darauf hin, dass eine Beeinflussung des endogenen Leptinspiegels weniger von der Körpermasse als vielmehr vom Fettgehalt der Nahrung abhängt und diskutieren in diesem Zusammenhang eine verminderte Leptinresponsivität als Folge eines erhöhten Plasmainsulinspiegels.

#### 4.4.2.2 Wiederholter Zugang zu Zusatzfutter

Auch Tiere, denen im Vorfeld insgesamt zwischen 30 und 70 Tagen Zusatzfutter angeboten wurde, reduzieren bei einer Leptinbehandlung nach einer mindestens 10-tägigen Standardfütterungs-Periode ihre Futtermittelaufnahme noch im gleichen Maße wie ausschließlich mit Standardfutter ernährte Tiere wenngleich nach längerer Anlaufzeit (siehe Abb. 18 unten). Allerdings kommt es jedoch bei Tieren mit dieser diätetischen Vorgeschichte bei erneuter Zusatzfütterung nicht nur zu einer rascheren Reduktion der Leptinresponsivität sondern auch zu einer verzögerten Wiederherstellung der Leptinresponsivität nach der Rückkehr zur Standardfütterung im Vergleich zu Tieren mit erstmaligem Zugang zu Zusatzfutter. Dabei steigt die Körpermasse mit Beginn der Zusatzfütterung in Verbindung mit einer großen Einzeltiervariabilität stark an, während sie nach Entzug des Zusatzfutters rasch wieder auf das Niveau vor der Zusatzfütterung absinkt (siehe Abb. 19 unten). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass auch bei einem längerem Gesamtzeitraum des Zugangs zu Zusatzfutter (insgesamt >30 Tage) kein Zusammenhang zwischen einer akuten Veränderung der Körpermasse und der Modifikation der Leptinresistenz besteht. Es bestätigt sich jedoch, dass auf der „diätetischen Vorgeschichte“ basierende, noch unbekannte hormonelle und neuronale Veränderungen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer diätinduzierten Adipositas mit funktioneller Leptinresistenz spielen müssen.

#### 4.4.2.3 Mögliche, die Leptinresponsivität beeinflussende Faktoren und deren Angriffspunkte im Leptin-System

Die vorliegende Untersuchung der ernährungsbedingten Modifikation der Leptinresponsivität berücksichtigt ausschließlich bei peripherer Verabreichung des Hormons auftretende Effekte. Vorhergehende Untersuchungen belegen allerdings, dass auch eine während hochkalorischer Fütterung anfänglich noch vorhandene zentrale Leptinwirkung modifizierbar ist (Lin et al. 2000). Dabei zeigt sich in der Literatur übereinstimmend zuerst ein Verlust der peripheren Leptinwirkung, bevor es zu einer Modifikation der zentralen Wirkung kommt (Van Heek et al. 1997, Lin et al. 2000, El-Haschimi et al. 2000).

In diesem Zusammenhang vermuteten verschiedene Autoren einen eingeschränkten Leptintransport über die Blut-Hirn-Schranke als Ursache für eine periphere Leptinresistenz, wobei von einer Sättigung des Leptintransportsystems infolge des bei adipösen Tieren erhöhten Plasmaleptinspiegels (El-Haschimi et al. 2000, Burguera et al. 2000, Burguera und Couce 2001) ausgegangen wird. Auch Banks et al. (1999) postulieren, dass eine periphere Leptinresistenz auf einer verringerten Transportkapazität der Blut-Hirn-Schranke beruht. In diesem Zusammenhang sollte jedoch eine Untersuchung von Schwartz et al. (1996) erwähnt werden, bei der selbst bei adipösen Tieren eine Leptinkonzentration im Liquor nachgewiesen wurde, die weit unter der Dissoziations-Konstante des Leptin-Rezeptor-Komplexes (Tartaglia et al. 1995) lag. Dementsprechend erscheint eine Aktivierung der zentralen Leptinrezeptoren durch physiologische CSF-Leptinspiegel unwahrscheinlich (Ahima und Flier 2000). Zudem befindet sich der Nucleus arcuatus, das Gehirnareal mit der höchsten Leptinrezeptordichte, in einem Bereich mit durchlässiger Blut-Hirn-Schranke und wird somit eher von der Konzentration des im Blut zirkulierenden Leptins beeinflusst.

Als Ursache für eine Leptinresistenz ist, neben einer Störung des Leptin-Transportes über die Blut-Hirn-Schranke, aber auch eine direkte Beeinflussung von Mediatoren innerhalb der zentralnervösen Leptin-Signalkaskade bzw. eine indirekte Modulation dieser durch externe Inhibitoren denkbar. So könnte die mit wachsender Dauer des hochkalorischen Nahrungsangebotes sinkende zentrale Leptinresponsivität auf eine Beeinflussung von Leptin-sensitiven Neuronen im Hypothalamus hinweisen (El-Haschimi et al. 2000). In der zitierten Studie zeigten Tiere, die seit 15 Wochen Zugang zu hochkalorischer Nahrung hatten, nach zentraler Leptinapplikation ein deutlich abgeschwächtes Ausmaß der

STAT3-Aktivierung im Vergleich zu ausschließlich mit Standardfutter gefütterten Kontrolltieren. Dieser Befund wurde von den Autoren als ein möglicher intrazellulärer Defekt in der Leptin-Signalkaskade zwischen der Rezeptor-Liganden-Bindung und der Aktivierung des STAT 3-Signals interpretiert (El-Haschimi et al. 2000).

Weiterhin wird in einer vorhergehenden Studie vermutet, dass SOCS-3 möglicherweise für eine Hemmung des Leptin-Transduktionsweges verantwortlich ist (Ahima und Flier 2000). Diese Hypothese wird einerseits durch Befunde, die eine gesteigerte Expression von SOCS-3 im Nucleus arcuatus sowie im dorsomedialen Hypothalamus als Folge einer Leptinapplikation nachweisen, gestützt (Bjorbaek et al. 1998). Andererseits bleibt die SOCS-3-Expression bei Zugang zu hochkalorischer Nahrung trotz eines Anstiegs des Plasmaleptinspiegels in Verbindung mit einer Erhöhung der Körpermasse jedoch unbeeinflusst (Peiser et al. 2000). Dieser Befund weist darauf hin, dass das Angebot einer fettreichen Diät allein nicht ausreicht, um bei Tieren ohne genetische Prädisposition für Adipositas über Faktoren wie SOCS-3 eine Unterdrückung des Leptin-Transduktionsweges zu erreichen. In Anbetracht dieser vielfältigen und teilweise auch kontroversen Befunde und Erklärungsansätze lässt sich abschließend bemerken, dass zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch keine eindeutige Aussage über die Ursachen einer aufgrund eines hochkalorischen Nahrungsangebotes veränderten Leptinresponsivität möglich ist.

#### **4.4.3 Wechselwirkungen zwischen Körpermasse, Gesamtenergieaufnahme und Leptinresponsivität bei wechselndem Nahrungsangebot**

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Körpermasse und der jeweiligen Energieaufnahme (siehe Abb. 20) während eines periodischen Wechsels des Nahrungsangebotes nachgewiesen werden. Dabei zeigen Tiere mit einer niedrigen Körpermasse in Perioden mit ausschließlicher Fütterung von Standardfutter die höchste Energieaufnahme, während in Perioden mit Zugang zu Zusatzfutter Tiere mit hoher Körpermasse die meiste Gesamtenergie aufnehmen. Die Befunde in Perioden mit ausschließlichem Zugang zu Standardfutter stehen im Einklang mit den von Widdowson et al. (1997) ermittelten Ergebnissen an Wistar-Ratten, bei denen Tiere mit diätinduzierter Adipositas infolge eines hochkalorischen Nahrungsangebotes über 49 Tage nach dessen Entzug in den ersten 7 Tagen ihre Futteraufnahme im Vergleich zu den ausschließlich von Standardfutter ernährten Tieren reduzieren. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass

es nach Entzug des hochkalorischen Nahrungsangebotes zu einer Wiederherstellung eines durch den endogenen Leptinspiegel vermittelten Sättigungssignals kommt. In der zitierten Studie konnte eine Wiederherstellung der Leptinresponsivität dadurch belegt werden, dass eine 7 Tage nach Futterwechsel durchgeführte Leptininjektion (i.c.v.) eine schwache Reaktion bei den zuvor leptinresistenten Tieren auslöste.

Diese Vermutung wird auch durch eigene Befunde gestützt, bei denen sich 11 Tage nach Entzug eines energiedichten, attraktiven Zusatzfutters, zu welchem die Tiere zuvor, unterbrochen durch Standardfutterperioden, insgesamt zwischen 30 und 72 Tage Zugang gehabt hatten, eine signifikante Leptinwirkung auf die Futterraufnahme nach peripherer Leptinapplikation zeigte. Allerdings ist anzumerken, dass die spontane Reduktion der Futterraufnahme bereits 4-6 Tage nach der Rückkehr zu Standardfutter beobachtet wurde. Zu diesem Zeitpunkt war jedoch die Leptinresponsivität nur bei erstmaligem Zugang zu Zusatzfutter bereits zurückgekehrt, während sie bei Tieren mit über 30 Tagen Zugang zu Zusatzfutter noch nicht ihre ursprüngliche Stärke erreichte. Dagegen zeigte sich im Zusammenhang zwischen der Futterraufnahme vor Leptinbehandlung und der Körpermasse 4-6 Tage nach Rückkehr auf ausschließlich Standardfutter zwischen Tieren mit unterschiedlich langem vorhergehenden Zugang zu Zusatzfutter kein Unterschied. Weiterhin zeichnet sich in Perioden mit Zugang zu Zusatzfutter bei Tieren mit einer hohen Körpermasse eine bereits bei adipösen Menschen nachgewiesene erhöhte Aufnahme von süßen und fettreichen Nahrungsmitteln (Gibney et al. 1995, Karhunen et al. 1998) ab. Diese fördert eine weitere Erhöhung der Körpermasse aufgrund der höheren Energiedichte (Drewnowsky 1998) des Zusatzfutters ohne einen Anstieg der absolut aufgenommenen Nahrungsmenge (Seagle et al. 1997).

In Bezug auf die Leptinresponsivität zeigt sich in Perioden mit ausschließlicher Standardfütterung, dass Tiere mit niedriger Körpermasse die stärkste Reduktion der Futterraufnahme zeigen (siehe Abb. 21 oben). Bei der Verabreichung von Zusatzfutter ergibt sich dagegen keine Korrelation zwischen den beiden Parametern (siehe 21 unten). Da sich hierbei keine Abhängigkeit von der Gesamtdauer der hochkalorischen Fütterung gezeigt hatte, werden sowohl Daten von Tieren erfasst, die erstmalig Zugang zu Zusatzfutter hatten und dabei nur eine geringe Erhöhung ihrer Körpermasse zeigten als auch von Tieren, die bereits über 30 Tage Zugang zu Zusatzfutter hatten, was bei erneutem Zugang zu Zusatzfutter einen starken Anstieg ihrer Körpermasse mit großer Streuung der Einzeltierwerte zur Folge hatte (siehe Abb. 19 unten). Dabei bestätigt sich innerhalb von Perioden mit ausschließlicher

Standardfütterung der Zusammenhang zwischen einer diätinduzierten Adipositas und einer funktionellen Leptinresistenz. Bei Zugang zu Zusatzfutter dagegen kommt es anscheinend auch bei normalgewichtigen Tieren zu kurzfristigen, die Leptinresponsivität hemmenden hormonellen und neuronalen Veränderungen, die keine ausgeprägte Veränderung der Körpermasse als Voraussetzung haben. Hierzu zählen, neben den bereits in 4.4.2 erwähnten möglichen Ursachen, vor allem Veränderungen des endogenen Leptinspiegels (Cooling et al. 1998, Lin et al. 1998, Ziotopoulou et al. 2000, Lin et al. 2001) und des Plasmainsulinspiegels (Harte et al. 1999).

#### **4.4.4 Diskussion einer leptinbedingten Beeinflussung der Attraktivität verschiedener Futtersorten**

Obwohl die Beurteilung der Effekte einer Langzeit-Leptinbehandlung auf die Gesamtenergieaufnahme und die Körpermasse von adipösen Tieren, die zwei verschiedene Sorten Zusatzfutter erhalten, anhand von Mittelwerten aufgrund starker individueller Unterschiede in den Ausgangswerten sowie in der Leptinwirkung kritisch zu beurteilen ist, geht aus den ermittelten Befunden aufgrund der nur geringfügigen Leptin-induzierten Verschiebung in der anteiligen Aufnahme der verschiedenen Futtersorten klar hervor, dass eine Beeinflussung der Attraktivität der 3 angebotenen Futtersorten ausgeschlossen werden kann. So zeigen die Tiere sowohl vor als auch während der Behandlung mit Leptin eine ca. doppelt so hohe Aufnahme des ZF 2 als des ZF 1, während das Standardfutter aufgrund seines nur sehr geringen Anteils vernachlässigt werden kann. Dabei stellt die in der weissen Kuvertüre enthaltene Saccharose eine süße Geschmackskomponente dar, während der Kohlenhydrat-Anteil der parallel angebotene Stärkeschokolade ausschließlich aus neutral schmeckender Stärke besteht. In diesem Zusammenhang muss jedoch vorausgehend erwähnt werden, dass die Fähigkeit der in dieser Studie verwendeten C57Bl/6J-Mäusen, süße Substanzen zu schmecken, im Vergleich zu anderen Mäusestämmen als mittelstark ausgeprägt eingestuft werden kann (Capeless und Whitney 1995). Die auch unter Leptin-einfluss weiterhin bestehende Präferenz der Tiere für das neutral schmeckende ZF 2, steht im Gegensatz zu den von Kawai et al. (2000) ermittelten Ergebnissen, bei denen die Applikation von Leptin zu einer selektiven Hemmung der Ansprechbarkeit auf süßen Geschmack führte. Dabei ist jedoch zu beachten, dass in dieser vorhergehenden Studie ausschließlich Effekte auf neuronal-zellulärer Ebene betrachtet werden, die erhaltenen Ergebnisse am Tiermodell jedoch nicht verifiziert wurden.

Weiterhin muss jedoch auch erwähnt werden, dass in den beiden Zusatzfuttersorten die Art des Fettes variiert: bei der Herstellung des ZF 1 wurde Kakaobutter, bei der von ZF 2 Kokosfett verwendet. Dabei handelt es sich übereinstimmend bei beiden Fettsorten um Fette mit überwiegend gesättigten Fettsäuren. In der Literatur konnte jedoch bisher neben der bereits bei C57Bl/6-Mäusen bekannten Makronährstoffpräferenz für Fett allgemein (Smith et al. 1999; Smith et al. 2000) keine Präferenz für eine der beiden Fettsorten nachgewiesen werden. Dennoch erscheinen aufgrund der großen Anzahl von möglicherweise die Leptinwirkung beeinflussenden Faktoren für eine abschließende Beurteilung einer leptinbedingten Beeinflussung der Schmackhaftigkeit von hochkalorischer Nahrung jedoch weiterführende Untersuchungen, die auch normalgewichtige Tiere mit physiologischer Leptinresponsivität einschließen, sinnvoll.

#### 4.5 FAZIT

Grundsätzlich muss innerhalb der westlichen Industrienationen als Ursache für die Entstehung einer Adipositas vor allem die überhöhte Aufnahme von energiedichter, attraktiver Nahrung in Kombination mit einer diätinduzierten Leptinresistenz angesehen werden. Zusätzlich könnte der nahezu permanente Aufenthalt im thermoneutralen Bereich eventuell die Ausbildung einer funktionellen Leptinresistenz fördern. Die Relevanz dieser beiden Faktoren für eine adäquate Regulation des Körperfettgehaltes durch das Leptin-system konnte in der vorliegenden Studie auch am Modell der C57Bl/6-Maus bestätigt werden. So zeigte sich unter thermoneutralen Bedingungen vor allem ein deutlich höherer Körperfettgehalt und eine Leptinwirkung, die sich zwar qualitativ nicht von der unter normalen Haltungsbedingungen unterscheidet, quantitativ jedoch bei freiem Zugang zu Standardfutter eine Reduktion aufweist. Im Hinblick auf die Fragestellung, ob und in wie weit der periodische Zugang zu hochkalorischer Zusatznahrung die unter normalen Fütterungsbedingungen deutlich ausgeprägten Leptineffekte unterdrückt, zeigt sich in der vorliegenden Untersuchung klar ein signifikanter Einfluss sowohl der Dauer der akuten Fütterungsperiode als auch der Gesamtdauer des Angebotes eines Zusatzfutters. Weiterhin scheinen in diesem Zusammenhang auch epigenetische Faktoren relevant zu sein, die den Körpermassenanstieg bei Zugang zu Zusatzfutter beeinflussen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass für Menschen der westlichen Industriestaaten sowie deren Haustiere sowohl Ergebnisse der tierexperimentellen Leptinforschung unter üblichen Haltungsbedingungen

als auch deren Konsequenzen zur Vermeidung von Adipositas nur beschränkt anwendbar sind. Abschließend sind jedoch Folgestudien nötig, um einerseits die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit an einer höheren Tierzahl zu bestätigen sowie andererseits die Modifikation der Leptinwirkung bei Zugang zu hochkalorischer Nahrung in Kombination mit thermoneutralen Bedingungen zu untersuchen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In Anbetracht der bekannten Leptinwirkung auf den Körperfettgehalt bei Nagetieren unter standardisierten Laborbedingungen (d.h. bei normalen Haltungstemperaturen zwischen 22 und 24°C und ausschließlichem Zugang zu fettarmer, kohlenhydrat- und ballaststoffreicher Nahrung) stellt sich die Frage, ob dieser Effekt auch unter für den Menschen relevanten Umweltfaktoren auftritt. Gegenstand der vorliegenden Studie ist daher die Untersuchung am Beispiel der C57Bl/6J-Maus, ob und in wieweit es zu einer Modifikation der Leptinwirkung bei Thermoneutralität bzw. bei periodischem Zugang zu hochkalorischer Zusatznahrung kommt, d.h. bei zwei der für den modernen Menschen charakteristischen Umweltunterschieden zum üblichen Tiermodell. Um Interaktionen zwischen der Umgebungstemperatur und dem hochkalorischen Zusatzfutter zu vermeiden, wurden die beiden Faktoren getrennt voneinander untersucht.

Aufgrund widersprüchlicher Literaturangaben erfolgte vor Beginn der Leptinbehandlungen die Ermittlung der Thermoneutralzone (=TNZ) des für die Untersuchung verwendeten C57Bl/6J-Stammes, wobei im Unterschied zu bisherigen Untersuchungen erstmalig der Begriff der 24-h-TNZ eingeführt wurde, um die Zone des minimalen thermoregulatorischen Energieaufwand bei Langzeituntersuchungen zu ermitteln. Dabei wurden bei den jeweils über mehrere Tage getesteten  $T_a$  - vor allem bei der Bestimmung der oberen kritischen Temperatur - neben der Stoffwechselrate (MR) auch andere physiologische Größen berücksichtigt. Anhand von Auswertungen des Verlaufes von Körpermasse und Futteraufnahme sowie minimaler und maximaler MR wurde somit 34°C als eine  $T_a$  ermittelt, die sowohl in der 24-h-TNZ von Tieren mit ad libitum als auch mit limitiertem Futterzugang liegt.

Bei der Durchführung von zehntägigen Leptinbehandlungen bei 34°C stand die Modifikation der Körperzusammensetzung aufgrund der Beeinflussung von Energiezufuhr und Energiedissipation während ad libitum und limitierter Fütterung im Vordergrund. Die unter thermoneutralen Bedingungen ermittelten Leptineffekte wurden mit Ergebnissen aus analog durchgeführten Untersuchungen bei 24°C (Döring 2000) verglichen, um die die Stärke der Reaktion bestimmenden Faktoren einzugrenzen. Dabei zeigte sich, dass die Vermittlung der Leptinwirkung auf den Körperfettgehalt bei Nagetieren unter thermoneutralen Bedingungen ebenso wie unter normalen Haltungstemperaturen in

Abhängigkeit von der momentanen Stoffwechsellage entweder über eine Steigerung der Energieabgabe (limitierter Futterzugang) oder über eine Reduktion der Energieaufnahme (ad libitum Fütterung) erfolgen kann. Einen interessanten Erstbefund stellte dabei die bei den behandelten Tieren mit limitiertem Futterzugang auftretende leichte, jedoch signifikante Erhöhung der MR unter thermoneutralen Bedingungen dar, die auf einer Verschiebung der MR aus dem Bereich niedriger in den Bereich mittlerer Stoffwechselraten beruht. Dies weist darauf hin, dass Leptin auch unter thermoneutralen Bedingungen und in Abwesenheit torporartiger Zustände der mit einer Nahrungs-limitierung einhergehenden Stoffwechselsenkung entgegenwirken kann, im Hinblick auf die menschlichen Lebensbedingungen ein sehr wichtiger Hinweis. Nur bei Tieren mit ad libitum Futterzugang erschien die leptinbedingte Reduktion der Körperfettmasse bei 34°C schwächer als bei Kältebelastung (24°C), wobei ein Vergleich der Ergebnisse verschiedener Studien, insbesondere bei noch geringer N-Zahl unter dem Gesichtspunkt von Versuchsgruppenunterschieden mit entsprechender Vorsicht zu interpretieren ist.

Weiterhin wurde die Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas in Abhängigkeit von periodischer Fütterung sensorisch attraktiver hochkalorischer Zusatznahrung untersucht, die neben der faserreichen, wenig energiedichten Standard-Nagetierdiät angeboten wurde. Dabei wurde der C57Bl/6J-Inzuchtstamm aufgrund seiner Neigung zur Ausprägung einer diätinduzierten Adipositas verwendet. Neben dem Zusammenhang zwischen der Leptinresponsivität und der Dauer des Angebotes hochkalorischen Zusatzfutters wurden weitere, die Modifikation der Leptinresponsivität beeinflussende Faktoren - wie die Körpermasse und die Gesamtenergieaufnahme - in die Auswertung mit einbezogen. Dabei zeigt sich ein signifikanter Einfluss sowohl der Dauer der akuten Fütterungsperiode als auch der Gesamtdauer des Angebotes eines Zusatzfutters. Dabei ließen sich individuelle Unterschiede in der Körpermasse nachweisen, die in einem isogenen Stamm vorwiegend den Einfluss epigenetischer Faktoren widerspiegeln.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen klar die Beeinflussung der Leptinresponsivität durch die beiden untersuchten Faktoren, thermoneutrale Bedingungen und Zugang zu hochkalorischem Zusatzfutter, die in Bezug auf die Lebensbedingungen von Menschen der westlichen Industriestaaten sowie deren Haustieren wesentlich erscheinen. Sie zeigen folglich die Grenzen der Übertragbarkeit von Ergebnissen der tierexperimentellen Leptinforschung unter üblichen Haltungsbedingungen sowie deren Konsequenzen zur Vermeidung von Adipositas auf.

## 6 SUMMARY

The well-known effects of leptin treatment in rodents have mostly been observed under standard laboratory conditions (ambient temperature 20-24°C and with chow as food, i.e. low-fat and high-fibre food). This raises the question, to which degree is it possible to extrapolate from these observations on humans living most of their time in thermoneutrality and having access to palatable, high-caloric food. The current study was designed to analyse modifications of leptin effects in rodents under the influence of “human-like” conditions, using the C57Bl/6J mouse strain as example. For this purpose animals were either studied in thermoneutral conditions or they were given periodically access to highly palatable, high-caloric food in addition to chow. In view of possible interactions between thermoneutrality and periodic access to high-caloric food both conditions were analysed separately.

Because information in the literature concerning the thermoneutral zone (TNZ) of mice are contradictory, its determination in the strain used was an important precondition. Different from previous investigations, long-term metabolic studies were carried out to determine a 24-h-TNZ as the condition of minimal thermoregulatory energy expenditure for the entire nycthemeral 24-h range. In approaching the TNZ various temperature conditions were tested for several days. Apart from measuring metabolic rate (MR), recordings of further physiological parameters, such as food intake and body mass, turned out to be important especially in determining the upper critical temperature. According to analyses of the changes in body mass, in daily food intake and in the circadian minimum MR, as well as in the maximum MR, an ambient temperature of 34°C was found to be situated within the limits of the 24-h-TNZ for the C57Bl/6J mice, both with free and limited access to chow.

After 10 days of leptin treatment, changes in body composition of mice having either free or limited access to chow at 34°C were compared with corresponding measurements obtained at 24°C (i.e. moderate cold exposure). This comparison permitted delineating the factors determining the mode and degree of leptin action. It is known for the standard laboratory conditions and has been confirmed in the present study for thermoneutral conditions, that leptin effects are mediated in different ways, depending on the state of metabolic activity: Energy expenditure is augmented, when it had been reduced in food-restricted animals before the leptin treatment, or food intake is decreased in ad libitum fed

animals. In ad libitum fed animals leptin-induced reduction of body fat seemed to be more weakly expressed at thermoneutrality than at standard laboratory conditions, but this results requires further confirmation by studying larger samples and by taking into account other potential causes for group differences. As an important new result of this study, a slight but significant enhancement of energy expenditure at thermoneutral conditions was disclosed in food-restricted animals, an observation of great interest in view of the prevailing human living conditions.

Under the conditions of offering periodically choice between chow and a high-caloric diet, body fat accumulation was studied in C57Bl/6J mice as a strain prone to develop diet-induced obesity. In this experimental design not only the correlation between leptin responsiveness and the duration and repetition of access to high-caloric food was analysed, but body mass and food intake were also incorporated in the analysis as parameters potentially influencing leptin responsiveness. The results have clearly shown that both the length of single periods of access to high-caloric food, as well as the entire duration of repeated periods of access, are relevant for the time course and degree of leptin resistance development. With regard to the development of body mass and fat content, temporary and repeated access to high-caloric food resulted in large individual variations which presumably reflect influences of epigenetic factors in the investigated strain considered as isogenic.

The results of the present study clearly document, for the condition of a rather homogeneous genetic background as it exists in the C57Bl/6J mouse strain, the dependence of leptin responsiveness on both factors investigated: 1, the state of thermoneutrality and 2, the availability of a high-caloric component in the freely chosen daily food supply. These two factors characterise the metabolically relevant conditions prevailing in western developed countries for humans as well as for their domestic animals. Thereby, the results shed light on the limits to be observed in obesity research when attempting to generalise from the metabolic conditions in animal models on those of humans.

## 7 Literaturverzeichnis

**Ahima, R. S. and J. S. Flier (2000).** *Leptin*. Annual Review of Physiology 62: 413-437.

**Ahima, R. S., D. Prabakaran and J. S. Flier (1998).** *Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function*. Journal of Clinical Investigation 101: 1020-1027.

**Ahima, R. S., D. Prabakaran, C. Mantzoros, D. Qu, B. Lowell, E. Maratos-Flier and J. S. Flier (1996).** *Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting*. Nature 382(6588): 250-252.

**Aoki, N., M. Kawamura and T. Matsuda (1999).** *Lactation-dependend down regulation of leptin production in mouse mammary gland*. Biochimica et Biophysica Acta 1427: 298-306.

**Åstrand, P.-O. and K. Rodahl (1986).** in: *Textbook of Work Physiology*. Editors Åstrand, P.-O. and K. Rodahl, MacGraw-Hill Book Company, 3<sup>d</sup> Edition, New York.

**Aujard, F., M. Perret and G. Vannier (1998).** *Thermoregulatory responses to variations of photoperiod and ambient temperature in the male lesser mouse lemur: a primitive or an advanced adaptive character?* Journal of Comparative Physiology B 168: 540-548.

**Bado, A., S. Levasseur, S. Attoub, S. Kermorgant, J. P. Laigneau, M. N. Bortoluzzi, L. Moizo, T. Lehy, M. Guerre-Millo, Y. Le Marchand-Brustel and M. J. Lewin, (1998).** *The stomach is a source of leptin*. Nature 394: 790-793.

**Banks W. A., C. R. Di Palma and C. L. Farrell (1999).** *Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity*. Peptides 20: 1341-1345.

**Banks, W. A., A. J. Kastin, W. Huang, J. B. Jaspan and L. M. Maness (1996).** *Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin*. Peptides 17: 305-311.

**Baumann, H., K. K. Morella, D. W. White, M. Dembski, P. S. Bailon, H. K. Kim, C. F. Lai and L. A. Tartaglia (1996).** *The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors.* Proceedings of The National Academy Of Science USA 93: 8374-8378.

**Beck J. A., S. Lloyd, M. Hafezparast, M. Lennon-Pierce, J. T. Eppig, M. F. W. Festing and E. M. C. Fisher (2000).** *Genealogies of mouse inbred strains.* Nature Genetics 24: 23-25.

**Bergen H. T., T. Mizuno, J. Taylor and C. V. Mobbs (1999).** *Resistance to diet-induced obesity is associated with increased proopiomelanocortin mRNA and decreased neuropeptide Y mRNA in the hypothalamus.* Brain Research 851: 198-203.

**Bjorbaek, C., J. K. Elmquist, P. Michl, R. S. Ahima, A. van Bueren, A. L. McCall and J. S. Flier (1998).** *Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels.* Endocrinology 139: 3485-3491.

**Black B. L., J. Croom, E. J. Eisen, A. E. Petro, C. I. Edwards and R. S. Surwit (1998).** *Differential effects of fat and sucrose on body composition in A/J and C57Bl/6J mice.* Methods of Clininical Experience. 47 : 1354-1359.

**Blackwell, B. N., T. J. Bucci, R. W. Hart and A. Turturro (1995).** *Longevity, body weight, and neoplasia in ad libitum-fed and diet-restricted C57BL6 mice fed NIH-31 open formula diet.* Toxicologic Pathology 23: 570-582.

**Blundell, J. E. and A. Tremblay (1995).** *Appetite control and energy (fuel) balance.* Nutrition Reviews 8: 225–242.

**Boden, G., X. Chen, M. Mozzoli and I. Ryan (1996).** *Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects.* Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 81: 3419-3423.

**Boss, O., S. Samec, F. Kühne, P. Bijlenge, F. Assimacopoulos-Jeannet, J. Seydeoux, J.-P. Giacobino and P. Muzzin (1998).** *Uncoupling protein-3 expression in rodent skeletal muscle is modulated by food intake but not by changes in environmental temperature.* The Journal of Biological Chemistry 273: 5-8.

**Bouali, S. M., A. Fournier, S. St-Pierre and F. B. Jolicœur (1995).** *Influence of ambient temperature on the effects of NPY on body temperature and food intake.* Pharmacology, Biochemistry and Behavior 50: 473-475.

**Bronson, F. H., P. D. Heidemann and M. C. Kerbeshian (1991).** *Lability of fat stores in peripubertal wild house mice.* Journal of Comparative Physiology B 161: 15-18.

**Bultman, S. J., E. J. Michaud and R. P. Woychik (1992).** *Molecular characterization of the mouse agouti locus.* The Cell 71: 1195-1204.

**Burguera B and M. E. Couce (2001).** *Leptin access into the brain, a saturated transport mechanism in obesity.* Physiology & Behavior 74: 717-720.

**Burguera B., M. E. Couce, G. L. Curran, M. D. Jensen, R. V. Lloyd, M. P. Clearly and J. F. Poduslo (2000).** *Obesity is associated with a decreased leptin transport across the blood-brain barrier in rats.* Diabetes 49: 1219-1223.

**Cabanac, M. (1972).** *Thermoregulatory Behavior.* in: *Essays on Temperature Regulation*, Editors Bligh, J. and R. Moore, North Holland Publishing Company, Amsterdam, 19-36.

**Cabib, S. and N. Bonaventura (1997).** *Parallel strain-dependent susceptibility to environmentally-induced stereotypies and stress-induced behavioral sensitization in mice.* Physiology & Behavior 61: 499-506.

**Campfield, L. A., F. J. Smith, Y. Guisez, R. Devos and P. Burn (1995).** *Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks.* Science 269: 546-549.

**Cao, G. Y., R. V. Considine and R. B. Lynn (1997).** *Leptin receptors in the adrenal medulla of the rat.* American Journal of Physiology E 273: 448-452.

**Capeless, C. G. and G. Whitney (1995).** *The genetic basis of preference for sweet substances among inbred strains of mice: preference of ratio phenotypes and the alleles of the Sac and dpa Loci.* Chemical Senses 20: 291-298.

**Caro J. F., J. W. Kolaczynski, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, I. Opentanova, W. H. Goldman, R. B. Lynn, P. L. Zhang, M. K. Sinha and R. V. Considine (1996).** *Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance.* Lancet 348: 159-161.

**Chen, Y. and M. L. Heiman (2000).** *Chronic leptin administration promotes lipid utilization until fat mass is greatly reduced and preserves lean mass of normal female rats.* Regulatory Peptides 92: 113-119.

**Christopherson, R. J. and B. A. Young (1986).** *Effect of cold environments on domestic animals.* in: *Grazing Research at Northern Latitudes.* Editor O. Gudmundsson, NATO ASI Series, Plenum Press, New York, 247-257.

**Cioffi, J. A., J. Vanblerkom, M. Antczak, A. Shafer, S. Wittmer and H. R. Snodgrass (1997).** *The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles.* Molecular Human Reproduction 3: 467-472.

**Clément, K., C. Vaisse, N. Lahlou, S. Cabrol, V. Pelloux, D. Cassuto, M. Gormelen, C. Dina, J. Chambaz, J. M. Lacorte, A. Basdevant, P. Bougneres, Y. Lebouc, P. Froguel and B. Guy-Grand (1998).** *A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction.* Nature 392: 398-401.

**Cohen, S., S. Line, S. B. Manuck, B. S. Rabin, E. R. Heise and J. R. Kaplan (1997).** *Chronical social stress, social status, and susceptibility to upper respiratory infections in nonhuman primates.* Psychosomatic Medicine 59: 213-221.

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

**Considine R. V., E. L. Considine, C. J. Williams, M. R. Nyce, S. A. Magosin, T. L. Bauer, E. L. Rosato, J. Colberg and J. F. Caro (1995).** *Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity.* Journal of Clinical Investigation 95: 2986-2988.

**Considine, R. V. and J. F. Caro (1997).** *Leptin and the regulation of body weight.* International Journal of Biochemistry & Cell Biology 29: 1255-1272.

**Considine, R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, C. C. Marco, I. J. Mckee, T. L. Bauer and F. J. Caro (1996).** *Serum immunoreactive leptin-concentrations in normal-weight and obese humans.* New English Journal of Medicine 334: 292-295.

**Cooling J., J. Barth and J. Blundell (1998).** *The high-fat phenotype: is leptin involved in the adaptive response to a high fat diet (high energy diet)?* International Journal of Obesitas and Related Metabolic Disorders 22: 1132-1135.

**Cumin, F., H. P. Baum and N. Levens (1996).** *Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney.* International Journal of Obesitas and Related Metabolic Disorders 20: 1120-1126.

**Cumin, F., H. P. Baum and N. Levens (1997).** *Mechanism of leptin removal from the circulation by the kidney.* Journal of Endocrinology 155: 577-585.

**De Vos, P., R. Saladin, J. Auwerx and B. Staels (1995).** *Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake.* Journal of Biological Chemistry 270: 15958-15961.

**Desautels, M., R. A. Dulos and B. Mozaffari (1986).** *Selective loss of uncoupling protein from mitochondria of surgically denervated brown adipose tissue of cold-acclimated mice.* *Biochemistry & Cell Biology* 64: 1125-1134.

**Dohm, M. R., J. P. Hayes and T. Jr. Garland (2001).** *The quantitative genetics of maximal and basal rates of oxygen consumption in mice.* *Genetics* 159: 267-277.

**Döring, H. (2000).** *Wirkung von rekombinantem Leptin auf den Energiehaushalt von Mäusen in Anhängigkeit vom Nahrungsangebot.* Dissertation, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität-Marburg.

**Döring, H., K. Schwarzer, B. Nüsslein-Hildesheim and I. Schmidt (1998a).** *Leptin selectively increases energy expenditure of food-restricted lean mice.* *International Journal of Obesity* 22: 83-88.

**Döring, H., K. Schwarzer and I. Schmidt (1998b).** *Unterschiedliche Effektorsysteme vermitteln gleiche Leptinwirkung auf den Körperfettgehalt von Mäusen.* *Aktuelle Ernährungsmedizin* 23: 247.

**Dörner, G. and A. Plagemann (1994).** *Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life.* *Hormone & Metabolic Research* 26: 213-221.

**Drewnowsky A. (1998).** *Energy density, palatability and satiety: Implications for weight control.* *Nutrition Reviews* 56: 347-353.

**Eckert, R. (1993).** in: *Tierphysiologie.* Editor R. Eckert, Thieme-Verlag, 2<sup>nd</sup> Edition, Berlin, 651-652.

**Eiden, S. (2002).** *Pharmakologische und genetische Eingriffe in das Leptinsystem und in andere an der Regulation des Energiehaushaltes beteiligte Hormonsysteme bei Mäusen.* Dissertation, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität-Marburg.

**Eiden, S., G. Preibisch and I. Schmidt (2001).** *Leptin responsiveness of juvenile rats: proof of leptin function within the physiological range.* The Journal of Physiology 530: 131-139.

**El-Haschimi K., D. D. Pierroz, S. M. Hileman, C. Bjorbaek and J. S. Flier (2000).** *Two effects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity.* Journal of Clinical Investigation 105: 1827-1832.

**Elimam, A., U. Knutsson, M. Bronnegard, P. Stiernä, K. Albertsson-Wikland and C. Marcus (1998).** *Variations in glucocorticoid levels within the physiological range affect plasma leptin levels.* European Journal of Endocrinology 139: 615-620.

**Ellis, H. I., M. Maskrey, T. N. Pettit and G. C. Whittow (1995).** *Thermoregulation in the brown noddy (Anous stolidus).* Journal of Thermal Biology 20: 307-313.

**Elmqvist, J. K., C. F. Elias, and C. B. Saper (1999).** *From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight.* Neuron 22: 221-232.

**Emilsson, V., Y. L. Liu, M. A. Cawthorne, N. M. Morton and M. Davenport (1997).** *Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion.* Diabetes 46: 313-316.

**Escobarmorreale, H. F., F. E. Delrey and G. M. Deescoabar (1997).** *Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat.* Endocrinology 138: 4485-4488.

**Esparza, J., C. Fox, I. T. Harper, P. H. Bennett, L. O. Schulz, M. E. Valencia and E. Ravussin (2000).** *Daily energy expenditure in Mexican and USA Pima Indians: Low physical activity as a possible cause of obesity.* International Journal of Obesity 24: 55-59.

**Færevik, H., D. Markussen, G. E. Øglænd and R. E. Reinertsen (2001).** *The thermoneutral zone when wearing aircrew protecting clothing.* Journal of Thermal Biology 26: 419-425.

**Flatt, J. P., E. Ravussin, K. J. Acheson and E. Jequier (1985).** *Effects of dietary fat on post-prandial substrate oxidation and on carbohydrate and fat balances.* Journal of Clinical Investigation 76: 1019 – 1024.

**Flier, J. S. (1998).** *Clinical Review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 83: 1407-1413.

**Frederich, R. C., A. Hamann, S. Anderson, B. Löllmann, B. B. Lowell and J. S. Flier (1995).** *Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action.* Nature Medicine 1: 1311-1314.

**Gibney, M., M. Sigman-Grant, J. L. Stanton and D. R. Keast (1995).** *Consumption of sugars.* American Journal of Clinical Nutrition 62 (Supplement): 178-193.

**Girardier L. and M. J. Stock (1983).** in: *Mammalian thermogenesis.* Editors: Girardier, L. and M. J. Stock, Chapman and Hall, London, New York, 50-98.

**Goodrick, G. J. and J. F. Nelson (1989).** *The decidual cell response in aging C57BL/6J mice is potentiated by long-term ovariectomy and chronic food restriction.* Journal of Gerontology B 44: 67-71.

**Gordon C. (1993).** *Metabolism.* in: *Temperature Regulation in Laboratory Rodents.* Editor C. Gordon, Cambridge University Press, USA, 62-71.

**Gormaker, S. L., A. Must, A. M. Sobol, K. Peterson, G. A. Colditz and W. H. Dietz (1996).** *Television viewing as a cause of increasing obesity among children in the United States.* Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine 150: 356-362.

**Grio, R. and M. Porpiglia (1994).** *Obesity: Internal medicine, obstetric and gynecological problems related to overweight.* Panminerva Medica 36: 138-141.

**Guenounou, M., J. Armier and F. Gaudin-Harding (1978).** *Effect of magnesium deficiency and food restriction on the immune response in young mice.* International Journal for Vitamin & Nutrition Research 48: 290-295.

**Haim, A. and N. Zisapel (1999).** *Daily rhythms of nonshivering thermogenesis in common spiny mice *Acomys cahirinus* under short and long photoperiods.* Journal of Thermal Biology 24: 455-459.

**Halaas, J. L., C. Boozer, J. Blair-West, N. Fidahusein and D. A. Denton (1997).** *Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice.* Proceedings of the National Academy of Science USA 94: 8878-8883.

**Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, M. Maffei, S. L. Cohen, B. T. Chait, D. Rabinowitz, R. L. Lallone, S. K. Burley and J. M. Friedman (1995).** *Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene.* Science 269: 543-546.

**Halleux, C. M., I. Servais, B. A. Reul, R. Detry and S. M. Brichard (1998).** *Multihormonal control of ob gene expression and leptin secretion from cultured human visceral adipose tissue: increased responsiveness to glucocorticoids.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 83: 902-910.

**Harris, R. B., J. Zhou, S. M. Jr. Redman, G. N. Smagin, S. R. Smith, E. Rodgers and J. J. Zachwieja (1998).** *A leptin dose-response study in obese (*ob/ob*) and lean (+/?) mice.* Endocrinology 139: 8-19.

**Harrold J. A., G. Williams and P. S. Widdowson (2000).** *Early leptin response to a palatable diet predicts obesity in rats: key role of melanocortin-4 receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus.* Journal of Neurochemistry 74: 1224-1228.

**Hart, J. S. (1971).** *Rodents.* in: *Comparative Physiology of Thermoregulation II.* Editor Whittow C. G., Academic Press, New York and London, 127-130.

**Harte R. A., E. A. Kirk, M. E. Rosenfeld and R. C. LeBoeuf (1999).** *Initiation of hyperinsulinemia and hyperleptinemia is diet dependent in C57Bl/6J mice.* Hormone and Metabolic Research 31: 570-575.

**Heldmaier G., S. Steinlechner, J. Rafael and B. Latteier (1982).** *Photoperiod and ambient temperature as environmental cues for seasonal thermogenic adaptation in the Djungarian hamster, Phodopus sungorus.* International Journal of Biometeorology. 26: 339-345.

**Heldmaier G., S. Steinlechner, J. Rafael and P. Vsiansky (1981).** *Photoperiodic control and effects of melatonin on nonshivering thermogenesis and brown adipose tissue.* Science 212: 917-919.

**Heldmaier, G., M. Klingenspor, M. Werneyer, B. J. Lampi, S. P. J. Brooks and K. B. Storey (1999).** *Metabolic adjustments during daily torpor in the Djungarian hamster.* American Journal of Physiology E 276: 896-906.

**Hensel, H., K. Brück and P. Raths (1973).** *Homeothermic organisms.* in: *Temperature and Life.* Editors Precht, P., J. Christophersen, H. Hensel and W. Larcher, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 532-536.

**Hill, J. O., D. Lin, F. Yakubu and J. C. Peters (1992).** *Development of dietary obesity in rats: influence of amount and composition of dietary fat.* International Journal of Obesity 16: 321-333.

**Himms-Hagen, J. (1985).** *Food restriction increases torpor and improves brown adipose tissue thermogenesis in ob/ob mice.* American Journal of Physiology E 248: 531-539.

**Himms-Hagen, J. and C. Villemure (1992).** *Number of mice per cage influences uncoupling protein content of brown adipose tissue.* Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine 200: 502-506.

**Hoffman-Goetz, L. and R. Keir (1984).** *Body temperature responses of aged mice to ambient temperature and humidity stress.* Journal of Gerontology 39: 547-551.

**Hoffman-Goetz, L. and R. Keir (1985).** *Fever and survival in aged mice after endotoxin challenge.* Journal of Gerontology 40: 15-22.

**Hoggard, N., J. G. Mercer, D. V. Rayner, K. Moar, P. Trayhurn and L. M. Williams (1997).** *Localization of the leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization.* Biochemical and Biophysical Research Communications 232: 383-387.

**Hoggard, N., L. Hunter, P. Trayhurn, L. M. Williams and J. G. Mercer (1998).** *Leptin and reproduction.* Proceedings of the Nutrition Society 57: 421-427.

**Horowitz, J. F., S. W. Coppack and S. Klien (2001).** *Whole-body and adipose tissue glucose metabolism in response to short-term fasting in lean and obese woman.* American Journal of Clinical Nutrition 73: 517-522.

**Hu, Y., B. Metzler and Q. Xu (1996).** *Discordant activation of stress-activated protein kinases or c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal protein kinases in tissues of heat-stressed mice.* The Journal of Biological Chemistry 272: 9113-9119.

**Hudson, J. W. (1978).** *Shallow daily torpor: A thermoregulatory adaptation.* in: *Strategies in the cold: natural torpidity and thermogenesis.* Editors L. C. Wang and J. W. Hudson, Academic press, New York and London: 67-108.

**Hudson, J. W. and I. M. Scott (1979).** *Daily torpor in the laboratory mouse, mus musculus var. albino.* Physiological Zoology 52: 205-218.

**Jansky, L. (1973).** *Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance.* Biological Reviews 48: 85-132.

**Johnson, M. S. and J. R. Speakman (2001).** *Limits to sustained energy intake. V. Effect of cold-exposure during lactation in *Mus musculus*.* Journal of Experimental Biology 204: 1967-1977.

**Karhunen L. J., R. I. Lappalainen, S. M. Haffner, R. H. Valve, H. Tuorila, H. Miettinen and M. I. J. Uusitupa (1998).** *Serum leptin, food intake and preferences for sugar and fat in obese women.* International Journal of Obesity 22: 819-821.

**Kawai K., K. Sugimoto, K. Nakashima, H. Miura and Y. Ninomiya (2000).** *Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice.* Proceedings of the National Academy of Science of the United States of American 97: 11044-11049.

**Kennedy, G. C. (1953).** *The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat.* Proceedings of the Royal Society of London 140: 578-592.

**Kleiber, M. (1961).** in: *The Fire of Life. An introduction to animal energetics.* Editor Kleiber, M., John Wiley and Sons Inc., New York.

**Klingenspor, M., H. Niggemann and G. Heldmaier (2000).** *Modulation of leptin sensitivity by short photoperiod acclimation in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*.* Journal of Comparative Physiology B 170: 37-43.

**Kopelman, P. G. (2000).** *Obesity as a medical problem.* Nature 404: 635-643.

**Kozak, W., C. A. Conn and M. J. Kluger (1995).** *Body temperature, motor activity, and feeding behavior of mice treated with  $\beta$ -chlornaltrexamine.* Physiology & Behavior 58: 353-362.

**Kraeft, S., K. Schwarzer, S. Eiden, B. Nuesslein-Hildesheim, G. Preibisch and I. Schmidt (1999).** *Leptin responsiveness and gene dosage for leptin receptor mutation (*fa*) in newborn rats.* American Journal Of Physiology E 276: 836-842.

**Kuczmarski, R. J., K. M. Flegal, S. M. Campbell and C. L. Johnson (1994).** *Increasing prevalence of overweight among US adults.* Journal of American Medical Association 272: A205-A211.

**Lacy, R. C. and C. B. Lynch (1979).** *Quantitative genetic analysis of temperature regulation in *Mus musculus*: First partitioning of variance.* Genetics 91: 743-753.

**Levin B. E. and A. A. Dunn-Meynell (2002).** *Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-induced obesity.* American Journal of Physiology R 282: 46-54.

**Levin, B. E. (2000).** *The obesity epidemic: Metabolic imprinting on genetically susceptible neural circuits.* Obesity Research 8: 342-347.

**Lin, L., R. Martin, A. O. Schaffhauser and D. A. York (2001).** *Acute changes in the response to peripheral leptin with alteration in the diet composition.* American Journal of Physiology R 280: 504-509.

**Lin, S. and X. F. Huang (1999).** *Altered hypothalamic c-Fos-like immunoreactivity in diet-induced obese mice.* Brain Research Bulletin 49: 215 – 219.

**Lin, S., T. C. Thomas, L. H. Storlien and X. F. Huang (2000).** *Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice.* International Journal of Obesity 24: 639-646.

**Lin, X., M. R. Chavez, R. C. Bruch, G. E. Kilroy, L. S. Simmons, L. Lin, H. D. Braymer, G. A. Bray and D. A. York (1998).** *The effects of a high fat diet on leptin mRNA, serum leptin and the response to leptin are not altered in a rat strain susceptible to high fat diet-induced obesity.* Journal of Nutrition 128: 1606 – 1613.

**Maffei, M., J. Halaas, E. Ravussin, R. E. Pratley, G. H. Lee, Y. Zhang, H. Fei, S. Kim, R. Lallone, S. Ranganathan, P. A. Kern and J. M. Friedman (1995).** *Leptin levels in human and rodents – measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects.* Nature Medicine 1: 1155-1161.

**Mantzoros, C. S., D. Q. Qu, R. C. Frederich, V. S. Susulic, B. B. Lowell, E. Maratos-Flier and J. S. Flier (1996).** *Activation of  $\beta_3$  adrenergic receptors suppresses leptin expression and mediates a leptin-independent inhibition of food intake in mice.* Diabetes 45: 909-914.

**Marhold, S. and A. Nagel (1995).** *The energetics of the common mole rat *Cryptomys*, a subterranean eusocial rodent from Zambia.* Journal of Comparative Physiology B 164: 636-645.

**Masuzaki, H., Y. Ogawa, M. Aizawa-Abe, K. Hosoda, J. Suga, K. Ebihara, N. Satoh, H. Iwai, G. Inoue, H. Nishimura, Y. Yoshimasa and K. Nakao (1999).** *Glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic mice overexpressing leptin with lethal yellow agouti mutation: usefulness of leptin for the treatment of obesity-associated diabetes.* Diabetes 48: 1615-1622.

**McBride, G. E., R. J. Christopherson and W. Sauer (1983).** *Metabolic rate and thyroid hormone concentrations of mature horses in response to changes in ambient temperature.* Canadian Journal of Animal Science 65: 375-382.

**Melnyk, A. and J. Himms-Hagen (1998).** *Temperature-dependent feeding: lack of role for leptin and defect in brown adipose tissue-ablated obese mice.* American Journal of Physiology R 43: 1131-1135.

**Melnyk, A., M.-E. Harper and J. Himms-Hagen (1997).** *Raising at thermoneutrality prevents obesity and hyperphagia in BAT-ablated transgenic mice.* American Journal of Physiology R 272: 1088-1093.

**Mercer, J. (2001).** *Glossary of terms for thermal physiology, 3<sup>d</sup> Edition.* U.I.P.S. Commission for Thermal Physiology, Chairman J. Mercer. The Japanese Journal of Physiology 51: 245-280.

**Mitchell, M. A. and A. J. Carlisle (1992).** *The effects of chronic exposure to elevated environmental temperature on intestinal morphology and nutrient absorption in the domestic fowl (Gallus domesticus).* Comparative Biochemistry & Physiology A-Comparative Physiology 101: 137-42.

**Montague, C. T., I. S. Farooqi, J. P. Whitehead, M. A. Soos, H. Rau, N. J. Wareham, C. P. Sewter, J. E. Digby, S. N. Mohammed, J. A. Hurst, C. H. Cheetham, A. R. Earley, A. H. Barnett, J. B. Prins and S. O`Rahilly (1997).** *Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans.* Nature 387: 903-908.

**Morton, N. M., V. Emilsson, Y. L. Liu and M. A. Cawthorne (1998).** *Leptin action in intestinal cells.* Journal of Biological Chemistry 273: 26194-26201.

**Mount, L. E. (1971).** *Metabolic rate and thermal insulation in albino and hairless mice.* Journal of Physiology Landes 217: 315-326.

**Mount, L. E. (1973).** *The Concept of Thermal Neutrality.* in: *Heat Loss from Animals and Man-Assessment and Control.* Editors Monteigh, J. L. and L. E. Mount, Butterworths Press, London, 425-435.

**Naggert, J. K., L. D. Fricker, O. Varlamov, P. M. Nishina, Y. Rouille, D. F. Steiner, R. J. Carroll, B. J. Paigen and E. H. Leiter (1995).** *Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity.* Nature Genetics 10: 135-142.

**Nagle, D.L., S. H. McGrail, J. Vitale, E. A. Wolf, D. J. Dussault, L. DiRocco, L. Holmgren, J. Montagno, P. Bork, D. Huszar, V. Fairchild-Huntress, P. Ge, J. Keilty, C. Ebeling, L. Baldini, J. Gilchrist, P. Burn, G. A. Carlson and K. J. Moore (1999).** *The mahogany protein is a receptor involved in suppression of obesity.* Nature 398: 148-152.

**Neel, J. V., A. B. Weder and S. Julius (1998).** *Type II diabetes, essential hypertension, and obesity as syndrome of impaired homeostasis: the "thrifty genotype" hypothesis enters the 21<sup>st</sup> century.* Perspectives of Biological Medicine 42: 44-74.

**Nelson, J. F., R. G. Gosden and L. S. Felicio (1985).** *Effect of dietary restriction on estrous cyclicity and follicular reserves in aging C57BL/6J mice.* Biology of Reproduction 32: 515-522.

**Noben-Trauth, K., J. K. Naggert, M. A. North and P. M. Nishina (1996).** *A candidate gene for the mouse mutation tubby.* Nature 380: 534-538.

**Nuesslein-Hildesheim, B. and I. Schmidt (1994).** *Is the circadian core temperature rhythm of juvenile rats due to a periodic blockade of thermoregulatory thermogenesis?* European Journal of Physiology 427: 450-454.

**Oufara, S., H. Barré, J.-L. Rouanet and J. Chatonnet (1987).** *Adaption to extreme ambient temperatures in cold-acclimated gerbils and mice.* American Journal of Physiology R 253: 39-45.

**Parekh, P. I., A. E. Petro, J. M. Tiller, M. N. Feinglos and R. S. Surwit (1998).** *Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57Bl/6J mice.* Metabolic and Clinical Experiments 47: 1089-1096.

**Patel, H. V., K. B. Freeman and M. Desautels (1987).** *Selective loss of uncoupling protein mRNA in brown adipose tissue on deacclimation of cold-acclimated mice.* Biochemistry & Cell Biology 65: 955-959.

**Peiser, C., G. P. McGregor and R. E. Lang (2000).** *Leptin receptor expression and suppressor of cytokine signaling transcript levels in high-fat-fed rats.* Life Science 67: 2971-2981.

**Pelleymounter, M. A. (1997).** *Leptin and the physiology of obesity.* Current Pharmaceutical Design 3: 85-98.

**Pelleymounter, M. A., M. J. Cullen, M. B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone and F. Collins (1995).** *Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice.* Science 269: 540-543.

**Physiologie des Menschen (1972).** *Band 8: Ernährung, Verdauung, Intermediärstoffwechsel.* Editors Gauer, Kramer and Jung, Urban & Schwarzenberg-Verlag, München, S. 2.

**Prentice, A. M. and S. A. Jebb (1995).** *Obesity in Britain - gluttony or sloth.* British Medical Journal 331: 437-439.

**Raphael J. and A. W. Herling (2000).** *Leptin effects in ob/ob mice under thermoneutral conditions depends not necessarily on central satiation.* American Journal Of Physiology R 278: 790-795.

**Rayner, D. V. and P. Trayhurn (2001).** *Regulation of leptin production: Sympathetic nervous system interactions.* Journal of Molecular Medicine 79: 8-20.

**Redman, P., C. Selman and J. R. Speakman (1999).** *Male short-tailed field voles (Microtus agrestis) build better insulated nests than females.* Journal of Comparative Physiology B 169: 581-587.

**Reifsnyder P. C., G. Churchill and E. H. Leiter (2000).** *Maternal environment and genotype interact to establish diabetes in mice.* Genome Research. 10: 1568-1578.

**Rosenbaum, M., M. Nicolson, J. Hirsch, S. B. Heymsfield, D. Gallagher, F. Chu and R. L. Leibel (1996).** *Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 81: 3424-3427.

**Russell, K., R. Sabin, S. Holt, R. Bradley and E. J. Harper (2000).** *Influence of feeding regime on body condition in the cat.* Journal of Small Animal Practice 41: 12-17.

**Saladin, R., P. Devos, M. Guerre-Millo, A. Leturge and J. Girard (1995).** *Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration.* Nature 377: 527-529.

**Scarpace P. J., M. Matheny, B. H. Pollock and N. Tumer (1997).** *Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure.* American Journal of Physiology E 273: 226-230.

**Scarpace, P. J. and N. Türmer (2001).** *Peripheral and hypothalamic leptin resistance with age-related obesity.* Physiology & Behavior 74: 721-727.

**Schmidt, I. (2002).** *Metabolic diseases: the environment determines the odds, even for genes.* News in Physiological Sciences 17: 115-121.

**Schmidt, I., H. Döring, O. Stehling, B. Nuesslein-Hildesheim, S. Steinlechner and K. Schwarzer (1997).** *Leptin disinhibits rather than stimulates sympathetically mediated energy expenditure.* in: *Leptin – The Voice of Adipose Tissue.* Editors Blum, W. F., W. Kiess and W. Rascher, J&J Barth Verlag, Heidelberg, Leipzig, 133-139.

**Schutz, Y., J. P. Flatt and E. Jequier (1989).** *Failure of dietary fat to promote fat oxidation: a factor favoring the development of obesity.* American Journal of Clinical Nutrition 50: 307-314.

**Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte Jr., R. J. Seeley and D. G. Baskin (2000).** *Central nervous system control of food intake.* Nature 404: 661-671.

**Sclafani, A. and D. Springer (1974).** *Dietary obesity in adult rats: Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes.* Physiology & Behavior 17: 461-471.

**Seagle H. M., B. M. Davy, G. Grunwald and J. O. Hill (1997).** *Energy density of self-reported food intake: variation and relationship to other food components.* Obesity Research 5 (Supplement): 87.

**Seeley, R. J. and M. W. Schwartz (1999).** *Neuroendocrine regulation of food intake.* Acta Paediatrica/Supplement 428: 58-61.

**Selman, C., T. K. Korhonen, L. Bünger, W. G. Hill and J. R. Speakman (2001).** *Thermoregulatory response of two mouse *Mus musculus* strains selectively bred for high and low food intake.* Journal of Comparative Physiology B 171: 661-668.

**Shek, E. W. and P. J. Scarpace (2000).** *Resistance to the anorexic and thermogenic effects of centrally administrated leptin in obese aged rats.* Regulatory Peptides 92: 65-71.

**Siegrist-Kaiser, C. A., V. Pauli, C. E. Juge-Aubry, O. Boss, A. Pernin, W. W. Chin, I. Cusin, F. Rohner-Jeanraud, A. G. Burger, J. Zapf and C. A. Meier (1997).** *Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue.* Journal of Clinical Investigation 100: 2858-2864.

**Sinha, M. K., J. P. Ohannesian, M. L. Heiman, A. Kriauciunas and T. W. Stephens (1996).** *Nocturnal rise of leptin in lean, obese and non-insulin dependend diabetes mellitus subjects.* Journal of Clinical Investigation 97: 1344-1347.

**Sivitz, W. I., S. A. Walsh, D. A. Morgan, M. J. Thomas and W. G. Haynes (1997).** *Effects of leptin on insulin sensitivity in normal rats.* Endocrinology 138: 3395-3401.

**Smith B. K., P. K. Andrews and D. B. West (2000).** *Macronutrient diet selection in thirteen mouse strains.* American Journal of Physiology R 278: 797-805.

**Smith B. K., P. K. Andrews, D. A. York and D. B. West (1999).** *Divergence in proportional fat intake in AKR/J and SWR/J mice endures across diet paradigms.* American Journal of Physiology R 277: 776-785.

**Song, X., G. Körtner and F. Geiser (1998).** *Temperature selection and use of torpor by the marsipial *Sminthopsis macroura*.* Physiology & Behaviour 65: 675-682.

**Speakman, J. R. and F. P. Rossi (1999).** *No support for socio-physiological suppression effect on metabolism of paired white mice (*Mus sp.*).* Functional Ecology 13: 373-382.

**Spiegelman B. M. and J. S. Flier (1996).** *Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture.* The Cell 87: 377-389.

**Starnier, M. W. (1977).** *Effect of environmental temperature and food intake on the distribution of fat in growing hairless mice.* British Journal of Nutrition 37: 279-284.

**Stehling, O., H. Döring, B. Nüsslein-Hildesheim, M. Olbort and I. Schmidt (1997).** *Leptin does not reduce body fat content but augments cold defense abilities in thermoneutrally reared rat pups.* European Journal of Physiology 434: 694-697.

**Stehling, O., H. Döring, J. Ertl, G. Preibisch and I. Schmidt (1996).** *Leptin reduces juvenile fat stores by altering the circadian cycle of energy expenditure.* American Journal of Physiology R 271: 1770-1774.

**Strobel, A., T. Issad, L. Camoin, M. Ozata and A. D. Strosberg (1998).** *A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity.* Nature Genetics 18: 213-215.

**Surwit R. S., A. E. Petro, P. I. Parekh and S. Collins (1997).** *Low plasma leptin in response to dietary fat in diabetes- and obesity-prone mice.* Diabetes 46: 1516-1520.

**Surwit R. S., C. L. Edwards, S. Murthy and A. E. Petro (2000).** *Transient effects of long-term leptin supplementation in the prevention of diet-induced obesity in mice.* Diabetes 49: 1203-1208.

**Talan, M. I., S. A. Kirov and N. A. Kosheleva (1996).** *Nonshivering thermogenesis in adult and aged C57BL/6J mice housed at 22°C and at 29°C.* Experimental Gerontology 31: 687-698.

**Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Wenig, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K. J. Moore, J. S. Smutko, G. G. Mays, E. A. Woolf, C. A. Monrezo and R. I. Tepper (1995).** *Identification and expression cloning of a leptin receptor OB-R.* The Cell 83: 1263-1271.

**The New Encyclopædia Britannica (1994).** *Mikropædia*, Ready Reference Band 2, 15<sup>th</sup> Edition, Encyclopædia Britannica Inc., 930.

**Trayhurn, P. (1979).** *Thermoregulation in the diabetic-obese (db/db) mouse.* European Journal of Physiology 380: 227-232.

**Trayhurn, P. and W. P. T. James (1978).** *Thermoregulation and non-shivering thermogenesis in the genetically obese (ob/ob) mouse.* European Journal of Physiology 373: 189-193.

**Trayhurn, P., J. S. Duncan and D. V. Rayner (1995).** *Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system.* Biochemical Journal 311: 729-733.

**Trayhurn, P., N. Hoggard, J. G. Mercer and D. V. Rayner (1999).** *Leptin: fundamental aspects.* International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders 23 (Suppl 1): 22-28.

**Van Heek, M., D. S. Compton, C. F. France, R. P. Tedesco, A. B. Fawzi, M. P. Graziano, E. J. Sybertz, C. D. Strader and H. R. Davis Jr. (1997).** *Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin.* Journal of Clinical Investigation 99: 385-390.

**Wagner, R., C. Oberste-Berghaus, F. Herpertz, W. F. Blum, B. Pelz, J. Hebebrand, W. Senf, K. Mann and N. Albers (2000).** *Time relationship between circadian variation of serum levels of leptin, insulin and cortisol in healthy subjects.* Hormone Research 54: 174-180.

**Wang, T., D. L. Hartzell, B. S. Rose, W. P. Flatt, M. G. Hulsey, N. K. Menon, R. A. Makula and C. A. Baile (1999).** *Metabolic responses to intracerebroventricular leptin and restricted feeding.* Physiology & Behavior 65: 839-848.

**Watson, P. M., S. P. Commins, R. J. Beiler, H. C. Hatcher and T. W. Gettys (2000).** *Differential regulation of leptin expression and function in A/J vs. C57Bl/6J mice during diet-induced obesity.* American Journal of Physiology E 279: 356-365.

**West, D. B., C. N. Boozer, D. L. Moody and R. L. Atkinson (1992).** *Dietary Obesity in nine inbred mouse strains.* American Journal of Physiology R 262: 1025-1032.

**Wickings, E. J. and A. F. Dixson (1992)** *Testicular function, secondary sexual development, and social status in male mandrills (Mandrillus sphinx).* Physiology & Behavior 52: 909-916.

**Widdowson, P. S., R. Upton, R. Buckingham, J. Arch and G. Williams (1997).** *Inhibition of food response to intracerebroventricular injection of leptin is attenuated in rats with diet-induced obesity.* Diabetes 46: 1782-1785.

**Williams, T. D., J. B. Chambers, R. P. Henderson, M. E. Rashotte and J. M. Overton (2002).** *Cardiovascular responses to caloric restriction and thermoneutrality in C57BL/6J mice.* American Journal of Physiology R 282: 1459-1467.

**Withers, P. C. (1977).** *Measurement of  $VO_2$ ,  $VCO_2$ , and evaporative water loss with a flow-through mask.* Journal of Applied Physiology 42: 120-123.

**Withers, P. C. (1992).** *Temperature* in: *Comparative Animal Physiology*. Editor P. C. Withers, Saunders College Publishing, HJB, Florida, 154-170.

**Yamamoto, Y., Y. Ueta, R. Serino, M. Nomura, I. Shibuya and H. Yamashita (2000).** *Effects of food restriction on the hypothalamic prepro-orexin gene expression in genetically obese mice.* Brain Research Bulletin 51: 515-521.

**Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994).** *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.* Nature 372: 425-432.

**Ziotopoulou M., C. S. Mantzoros, S. M. Hileman and J. S. Flier (2000).** *Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice.* American Journal of Physiology E 279: 838-845.

## DANKSAGUNG

Niemand ist eine Insel und so danke ich allen, die direkt und indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Sine qua non! Dabei möchte ich in erster Linie meine Mutter und meine Oma erwähnen, die mir nicht nur mein Tiermedizin-Studium ermöglicht, sondern mich auch in allen bisherigen Lebenslagen unterstützt haben.

Herrn Professor Dr. Rüdiger Gerstberger danke ich für die Übernahme der Betreuung an der Justus-Liebig-Universität in Gießen, die Begutachtung dieser Arbeit sowie seinen zahlreichen konstruktiven Anregungen.

Bei Herrn Professor Eckhart Simon möchte ich mich für zahlreiche hilfreiche Anregungen und Ratschläge, die nicht nur statistischen Fragen betrafen, bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Ingrid Schmidt für die Überlassung des Themas und ihr unermüdliches Engagement sowohl bei der Betreuung der Versuche als auch bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frank Voss und Helmut Busch aus der Computerabteilung danke ich für die Unterstützung bei zahlreichen Computerpannen, unserer Werkstatt für ihre zuverlässige Hilfe bei Reparaturen und ihre Kreativität bei Neuanfertigungen.

Roswitha Bender möchte ich für ihre Mithilfe bei labortechnischen Arbeiten, Kurt Steinhauer, Sina Scholz und Annette Löffler sowie dem übrigen Tierpfleger-Team für die Bereitstellung und Versorgung der Versuchstiere danken.

Blumen an Anne Lenk und Birgit May für den kritischen Blick über das vollendete Werk: sechs Augen sehen mehr als zwei!

Einen herzlichen Händedruck an meine Bürogenossin Michaela Socher für ein allzeit offenes Ohr sowie Entscheidungshilfen bei stilistischen „entweder-oder-Fragen“.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch für die „humanen Umweltbedingungen“ ☺ (siehe Erstversion der Einleitung) in unserer Arbeitsgruppe bei Andrea, Birgit, Björn, Carmen, Caro, Chris, Corinna, Darius, Heiko, Karin, Michaela, Nicole und Sandra bedanken.

Ich werde Euch alle vermissen!

Dabei gilt mein spezieller Dank Nicole Christ, die mir das Wesen der Maus näherbrachte und mit der ich eine ausserordentlich schöne Zeit in „unserer Lounge“ verlebte, meiner Mit(st)reiterin Chris Schubert, mit der der Tag sowohl für fach- und pferdebezogene als auch private Themen eindeutig zu wenig Stunden hatte, und natürlich Sandra Eiden, die von Anfang an mein persönlicher PostDoc war. Sie lieferte mir nicht nur den Ariadne-Faden für das sich vor mir auftürmende Computer-Labyrinth sondern auch so manchen motivierenden Einfall für Theorie und Praxis; darüber hinaus hoffe ich, dass unser privater Kontakt auch transatlantisch noch bestehen bleibt.

## ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation

**" Diätinduzierte und temperaturabhängige Störungen im Leptinsystem von  
C57Bl/6J-Mäusen "**

selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten..

Bad Nauheim, Mai 2004

Alexandra Steinbrück-Poulet