

**Muskelfasertypspezifische und hepatische Dynamik
des Fettsäurestoffwechsels
- eine in vivo ¹H-NMR-spektroskopische Studie
zur pharmakologischen Charakterisierung
antidiabetisch wirksamer Substanzen -**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Anja Beha

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen und der
Disease Group Metabolic Diseases
der AVENTIS PHARMA Deutschland GmbH

Betreuer: PD Dr. Andreas W. Herling

**Muskelfasertypspezifische und hepatische Dynamik
des Fettsäurestoffwechsels
- eine in vivo ¹H-NMR-spektroskopische Studie
zur pharmakologischen Charakterisierung
antidiabetisch wirksamer Substanzen -**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Anja Beha

Tierärztin aus Villingen-Schwenningen

Gießen 2004

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

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

1. Gutachter: PD Dr. Andreas W. Herling

2. Gutachter: Prof. Dr. Erich Eigenbrodt

Tag der Disputation: 14. Mai 2004

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den 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.

Abkürzungen	XI
I Einleitung.....	1
I.1 Zusammenhang zwischen Typ 2 Diabetes und Lipidstoffwechsel	1
I.1.1 Diabetes	1
I.1.1.a Grundlagen	1
I.1.1.b Epidemiologie	1
I.1.1.c Typ 2 Diabetes.....	2
I.1.2 Insulinresistenz.....	2
I.1.2.a Definition.....	2
I.1.2.b Betroffene Organe	3
I.1.3 Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und Lipidstoffwechsel	3
I.1.3.a Pathophysiologie der Insulinresistenz.....	3
I.1.3.b Rolle der LCACoA	7
I.1.3.c Rolle des intramyozellulären Lipids (IMCL).....	7
I.1.3.d Rolle des hepatozellulären Lipids (HepCL).....	8
I.2 Pharmakologische Beeinflussung von Typ 2 Diabetes	9
I.2.1 Biguanide	9
I.2.2 Sulfonylharnstoffe.....	10
I.2.3 α -Glukosidase-Inhibitoren	10
I.2.4 PPAR-Agonisten	10
I.2.4.a PPAR- γ -Agonisten (Thiazolidindione).....	11
I.2.4.b PPAR- α -Agonisten	12
I.2.5 Insulin... ..	12
I.3 Lipidstoffwechsel unter postabsorptiven Stoffwechselbedingungen	13
I.4 Problemstellung	15
I.4.1 Analysen.....	16
I.4.1.a intrazelluläre Lipide.....	16
I.4.1.b LCACoA.....	16
I.4.1.c Malonyl-CoA	17
I.4.2 Strukturierung der Dissertation.....	17
I.4.3 Wichtigste Resultate.....	18
II Material und Methoden.....	19
II.1 Versuchstiere	19
II.1.1 Tiermodelle.....	19

II.1.1.a	Wistar-Ratte.....	19
II.1.1.b	Zucker Diabetic Fatty-Ratte	19
II.1.2	Haltung der Tiere.....	20
II.1.3	Fütterung der Tiere.....	21
II.2	Testsubstanzen.....	21
II.2.1	Metformin	21
II.2.2	PPAR- γ -Agonist (Rosiglitazon)	21
II.2.3	PPAR- α -Agonist.....	21
II.3	Studiendesign	22
II.3.1	Studie bei 16 Wochen alten Wistar-Ratten (Abb. II.3-a).....	22
II.3.1.a	Bestimmung des intrazellulären Lipidgehaltes mittels $^1\text{H-NMR}$ - Spektroskopie (NMR-Gruppen)	22
II.3.1.b	Bestimmung biochemischer Parameter in Skelettmuskulatur und Leber (Satellitengruppen)	23
II.3.2	Studie bei 8 Wochen alten ZDF-Ratten (Abb. II.3-b).....	23
II.3.2.a	Bestimmung des intrazellulären Lipidgehaltes mittels $^1\text{H-NMR}$ - Spektroskopie (NMR-Gruppe)	23
II.3.2.b	Bestimmung biochemischer Parameter in Skelettmuskulatur und Leber (Satellitengruppe)	23
II.3.3	Studie bei 16 Wochen alten ZDF-Ratten (Abb. II.3-b).....	25
II.3.3.a	Bestimmung des intrazellulären Lipidgehaltes mittels $^1\text{H-NMR}$ - Spektroskopie (NMR-Gruppe)	25
II.3.3.b	Bestimmung biochemischer Parameter in Skelettmuskulatur und Leber (Satellitengruppe)	25
II.3.4	Behandlung von ZDF-Ratten mit Antidiabetika (Abb. II.3-c).....	27
II.3.4.a	Monitoring	27
II.3.4.b	Bestimmung des Körperfettanteils	27
II.3.4.c	Bestimmung von Malonyl-CoA und LCACoA	27
II.3.5	Postabsorptions-Studie bei ZDF-Ratten unter Behandlung mit Antidiabetika (Abb. II.3-c).....	29
II.3.5.a	Bestimmung des intrazellulären Lipidgehaltes mittels $^1\text{H-NMR}$ - Spektroskopie.....	29
II.4	Bestimmung der Stoffwechselfparameter im Blut	29
II.4.1	Parameter des Glukosestoffwechsels	30

II.4.2	Parameter des Lipidstoffwechsels	31
II.5	Bestimmung der Stoffwechselfparameter in Skelettmuskulatur und Leber	31
II.5.1	¹ H-NMR-Spektroskopie	31
II.5.1.a	Messung intramyozellulärer Lipide	32
II.5.1.b	Messung hepatozellulärer Lipide	34
II.5.1.c	Bestimmung des Körperfettanteils	34
II.5.2	Biochemische Parameter	35
II.5.2.1	Organentnahme	35
II.5.2.2	HPLC-Analytik	36
II.5.2.2.a	Bestimmung von tCr	37
II.5.2.2.b	Bestimmung von Malonyl-CoA.....	37
II.5.2.2.c	Bestimmung der LCACoA.....	38
II.5.2.3	Bestimmung des Wasseranteils in der Leber	43
II.5.2.4	Bestimmung des Glykogengehaltes in der Leber	43
II.5.2.5	Bestimmung des Triglyzeridgehaltes in der Leber.....	44
II.6	Auswertungen.....	45
II.6.1	Bestimmung der Stoffwechselfparameter in Skelettmuskulatur und Leber.....	45
II.6.1.a	¹ H-NMR-Spektroskopie.....	45
II.6.1.b	Biochemische Parameter.....	46
II.6.2	Statistik.	47
II.6.2.a	Varianzanalysen	47
II.6.2.b	Regressionsanalysen	47
III	Ergebnisse.....	48
III.1	Postabsorptionsstudie bei 16 Wochen alten Wistar-Ratten	48
III.1.1	Physiologische Parameter	48
III.1.2	Stoffwechselfparameter im Serum	49
III.1.3	¹ H-NMR-spektroskopische Untersuchungen („NMR-Gruppen“)	54
III.1.3.a	IMCL-Gehalt verschiedener Skelettmuskeltypen	54
III.1.3.b	Hepatozellulärer Lipidgehalt	56
III.1.4	Bestimmung biochemischer Parameter Skelettmuskulatur und Leber („Satellitengruppen“).....	57
III.1.4.a	Kreatingehalt verschiedener Skelettmuskeltypen	57
III.1.4.b	Malonyl-CoA in Skelettmuskulatur und Leber	58
III.1.4.c	LCACoA-Gehalt in Skelettmuskel und Leber	61

III.1.4.d	Lebergewicht, Glykogen-, Wasser-, und Lipidgehalt der Leber	63
III.2	Postabsorptionsstudie bei 8 Wochen alten ZDF-Ratten	65
III.2.1	Physiologische Parameter	66
III.2.2	Stoffwechselfparameter im Serum	67
III.2.3	¹ H-NMR-spektroskopische Untersuchungen („NMR-Gruppen“)	72
III.2.3.a	IMCL-Gehalt verschiedener Skelettmuskeltypen	72
III.2.3.b	Hepatozellulärer Lipidgehalt	74
III.2.4	Bestimmung biochemischer Parameter in Skelettmuskulatur und Leber („Satellitengruppen“)	75
III.2.4.a	Kreatingehalt verschiedener Skelettmuskeltypen	75
III.2.4.b	Malonyl-CoA in Skelettmuskulatur und Leber	76
III.2.4.c	LCACoA-Gehalt in Skelettmuskulatur und Leber	78
III.3	Postabsorptionsstudie bei 16 Wochen alten ZDF-Ratten	82
III.3.1	Physiologische Parameter	82
III.3.2	Stoffwechselfparameter im Serum	83
III.3.3	¹ H-NMR-spektroskopische Untersuchungen („NMR-Gruppen“)	88
III.3.3.a	IMCL-Gehalt verschiedener Skelettmuskeltypen	88
III.3.3.b	Hepatozellulärer Lipidgehalt	90
III.3.4	Bestimmung biochemischer Parameter in Skelettmuskulatur und Leber („Satellitengruppen“)	91
III.3.4.a	Kreatingehalt verschiedener Skelettmuskeltypen	91
III.3.4.b	Malonyl-CoA in Skelettmuskulatur und Leber	92
III.3.4.c	LCACoA in Skelettmuskulatur und Leber	94
III.4	Behandlung von obesen ZDF-Ratten mit Antidiabetika	98
III.4.1	Monitoring	98
III.4.1.a	Futter- und Wasserverbrauch	98
III.4.1.b	Physiologische Parameter	100
III.4.1.c	Stoffwechselfparameter im Serum	101
III.4.2	Bestimmung des Körperfettanteils	107
III.4.3	Bestimmung von Malonyl-CoA und LCACoA	108
III.4.3.a	Malonyl-CoA in der Leber	108
III.4.3.b	LCACoA-Gehalt in Skelettmuskel und Leber	109
III.5	Postabsorptionsstudie bei ZDF-Ratten unter Behandlung mit Antidiabetika	111
III.5.1	Physiologische Parameter	111

III.5.2 Stoffwechselfparameter im Serum	113
III.5.3 ¹ H-NMR-spektroskopische Untersuchungen	121
III.5.3.a IMCL-Gehalt verschiedener Skelettmuskeltypen	121
III.5.3.b Hepatozellulärer Lipidgehalt	125
IVDiskussion	127
IV.1 Biochemische und biophysikalische Veränderungen während postabsorptiver adipozytärer Lipolyse	127
IV.1.1 Insulinsensitive Wistar-Ratten	129
IV.1.2 Insulinresistente ZDF-Ratten.....	132
IV.1.3 Diabetische ZDF-Ratten.....	138
IV.1.4 Mit Antidiabetika behandelte ZDF-Ratten.....	139
IV.1.4.a Postabsorptive adipozytäre Lipolyse unter Behandlung mit einem PPAR- α -Agonisten	142
IV.1.4.b Postabsorptive adipozytäre Lipolyse unter Behandlung mit Rosiglitazon	145
IV.1.4.c Postabsorptive adipozytäre Lipolyse unter Behandlung mit Metformin	146
IV.2 Rolle der SCD.....	147
IV.2.1 Grundlagen.....	148
IV.2.1.a Gesättigte Fettsäuren (Palmitat und Stearinsäure)	148
IV.2.1.b Einfach ungesättigte Fettsäuren (Palmitoleinsäure und Ölsäure)	149
IV.2.1.c SCD-Isoformen.....	149
IV.2.1.d Regulation der SCD	150
IV.2.1.e Marker für die SCD-Aktivität.....	150
IV.2.1.f Mögliche Funktion der SCD im Organismus.....	151
IV.2.1.g SCD, Insulinresistenz und Diabetes	151
IV.2.1.h SCD-Aktivität im postabsorptiven Zustand	152
IV.2.2 Hemmung der SCD als therapeutische Maßnahme	153
IV.3 Zusammenhang von Muskelfasertyp, Substratoxidation und IMCL	154
IV.3.1 Fasertypen der ¹ H-NMR-spektroskopisch und biochemisch untersuchten Skelettmuskeln	154
IV.3.2 Fasertypveränderungen bei veränderten metabolischen Bedingungen	154
IV.3.3 Unterschiede im Lipidstoffwechsel bei verschiedenen Fasertypen	155

IV.4 Ausblick.....	156
V Zusammenfassung / Summary.....	157
V.1 Zusammenfassung	157
V.2 Summary.....	159
VILiteraturverzeichnis	161
VII Danksagung	172
VIII Anhang.....	a
VIII.1 Enzymatische Fasertypcharakterisierung verschiedener Skelettmuskeln.....	a
VIII.1.a Ergebnisse	b
VIII.2 Bestimmung der Fettsäurespezies im Rattenfutter	d
VIII.2.a Ergebnisse	e
VIII.3 Analyse der Lipidspezies im Fettgewebe.....	f
VIII.3.1 Fettgewebsanalyse bei 16 Wochen alten Wistar-Ratten.....	f
VIII.3.1.a Ergebnisse	f
VIII.3.2 Fettgewebsanalyse bei 8 Wochen alten ZDF-Ratten	h
VIII.3.2.a Ergebnisse	h
VIII.4 Bestimmung der Fettsäurespezies der FFS im Plasma.....	j
VIII.4.1 Bestimmung der Fettsäurespezies im Plasma bei 16 Wochen alten Wistar-Ratten	j
VIII.4.1.a Ergebnisse	j
VIII.4.2 Bestimmung der Fettsäurespezies im Plasma bei 8 Wochen alten obesen ZDF-Ratten.....	l
VIII.4.2.a Ergebnisse	l
VIII.4.3 Bestimmung der Fettsäurespezies im Plasma bei 16 Wochen alten ZDF- Ratten.....	n
VIII.4.3.a Ergebnisse	n
VIII.5 Anteile der Fettsäurespezies in verschiedenen Geweben und im Futter	p
VIII.5.1 Palmitat (C16:0)	p
VIII.5.2 Palmitoleinsäure (C16:1).....	r
VIII.5.3 Stearinsäure (C18:0).....	t
VIII.5.4 Ölsäure (C18:1).....	v

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ab ^J /ab ^J	Asebia-Maus; Tiermodell mit einem Defekt des Genes für die Stearoyl-CoA-Desaturase-1
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ADA	American Diabetes Association
aLPL	adipozytäre Lipoproteinlipase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
AMP-Lab	Labor für Angewandte Molekulare Physiologie
ang.	angefüttert
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Arbitrary Unit, willkürliche Einheit
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CoA	Coenzym A
CPT-I	Carnitin-Palmitoyl-Transferase I
DAG	Diacylglycerol
DG	Disease Group
“DI”	“Desaturation Index” (Desaturierungsindex)
DI	Diplomingenieur
EDL	Musculus Extensor Digitorum Longus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMCL	Extramyocellular Lipid (extramyozelluläres Lipid, adipozytäres Lipid)
FFS	freie Fettsäuren
FID	Free Induction Decay, freier Induktionsabfall
FOV	Field of View, Gesichtsfeld
FS	Fettsäure
FSTP	Fettsäuretransportprotein
g	Gramm
g	Relative Zentrifugal-Beschleunigung
G6P	Glukose-6-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
gef.	gefüttert
GLUT	Glukosetransportprotein
GPase	Glykogenphosphorylase
HbA1c	Glykohämoglobin
HepCL	Hepatozelluläres Lipid

Abkürzungen

HK	Hexokinase
HOADH	β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase
HO-Butyrat	Hydroxybutyrat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMCL	Intramyocellular Lipid (Intramyozelluläres Lipid)
IRS	Insulin Rezeptor Substrate
KGW	Körpergewicht
k_i	Dissoziationskonstante für den Enzym-Inhibitor-Komplex
Ktr.	Kontrolle
LCACoA	Long Chain Acyl Coenzyme A (langkettige aktivierte Fettsäure)
LO	Lead Optimisation
LONG	Musculus Longissimus Dorsi
LPL	Lipoprotein-Lipase
LUFA	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt
M.	Musculus (Muskel)
mLPL	muskuläre Lipoproteinlipase
n.b.	nicht bestimmbar
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
ob/ob-Maus	obese/obese; Tiermodell für Obesitas; homozygoter Defekt im Leptin-Gen
pH	pondus Hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration)
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
postabs.	postabsorptive Phase
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPAR-Ag.	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor Agonist
ppm	parts per million
PRESS	Point-Resolved Volume Selective Spectroscopy (volumenselektive Spektroskopie)
PUFA	polyunsaturated fatty acid (mehrfach ungesättigte Fettsäure)
r^2	Regressionskoeffizient, Bestimmtheitsmaß
RSD	relative standard deviation (relative Standardabweichung)
SCD	Stearoyl-CoA-Desaturase
SCD ^(-/-)	Maus mit einem homozygoten Defekt des Genes für die Stearoyl-CoA-Desaturase-1
SEM	mittlerer Fehler des Mittelwertes
Ser	Serin
SOL	Musculus Soleus
T	Tesla
Tab.	Tabelle
tCr	Gesamt-Kreatin

TE	Echozeit
Thr	Threonin
TIB	Musculus Tibialis Anterior
TR	Repetitionszeit
Tyr	Tyrosin
U	Umdrehungen
VLDL	Very-Low-Density-Lipoprotein
Voxel	Volume Pixel, Volume of interest (interessierendes Volumen)
vs.	versus
Wo.	Wochen
ZDF	Zucker Diabetic Fatty
ZF	Zucker Fatty

I Einleitung

I.1 Zusammenhang zwischen Typ 2 Diabetes und Lipidstoffwechsel

I.1.1 Diabetes

I.1.1.a Grundlagen

Unter dem Terminus „Diabetes Mellitus“ wird eine Gruppe metabolischer Erkrankungen zusammengefasst, welche durch Hyperglykämie gekennzeichnet sind. Diese entsteht durch Defekte in der Insulinsekretion und / oder der Insulinwirkung (THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2002).

HIMSWORTH unterschied 1936 erstmals zwischen einer insulin-sensitiven und einer insulin-insensitiven Form des Diabetes Mellitus. Letztere wird als Typ 2 Diabetes bezeichnet.

I.1.1.b Epidemiologie

Der Diabetes Mellitus stellt momentan eine der größten Bedrohungen für die menschliche Gesundheit dar (ZIMMET, 2000). Im Jahr 2000 waren weltweit 150 Millionen Menschen betroffen. Es wird erwartet, dass die Zahl der Erkrankten bis zum Jahr 2010 auf ca. 220 Millionen anwachsen wird (ZIMMET et al, 2001). Dabei ist der Typ 2 Diabetes mit über 90% die häufigste Form der Erkrankung.

Während beim Typ 2 Diabetes früher auch von „Alterszucker“ gesprochen wurde, tritt die Erkrankung heute bereits in jüngeren Jahren auf (BROSNAN et al, 2001).

Als Ursachen für die steigende Prävalenz werden vor allem die vermehrt sitzende Lebensweise bei kalorien- und fettreicher Ernährung gesehen (DIAMOND, 2003). Epidemiologische Studien zeigen, dass das Risiko, an Typ 2 Diabetes zu erkranken, mit der Höhe des „Body Mass Index“ (BMI = Körpergewicht in Kilogramm / Körpergröße in Meter²) als Indikator des Körper-Fettgehaltes ansteigt. Dies impliziert, dass die „Dosis“ an Körperfett einen wesentlichen Einfluss auf die Insulinsensitivität hat (COLDITZ et al, 1990).

1.1.1.c Typ 2 Diabetes

Während beim Typ 1 Diabetes ein absoluter Insulinmangel vorliegt, ist das Kennzeichen von Typ 2 Diabetes eine verminderte Wirkung des vorhandenen Insulins und somit ein relativer Insulinmangel.

Der Typ 2 Diabetes ist eine multifaktorielle Erkrankung. Neben der genetischen Komponente spielen Umweltfaktoren bei der Pathogenese eine große Rolle. Übergewicht und Bewegungsmangel erhöhen die Diabetesprävalenz.

Verantwortlich für die Entwicklung eines manifesten Typ 2 Diabetes ist sowohl das verminderte Ansprechen der Zielorgane auf Insulin (Insulinresistenz) als auch eine inadäquate Insulinsekretion durch die pankreatischen β -Zellen (GOLDSTEIN, 2002).

Der Krankheitsverlauf kann in verschiedene Stadien eingeteilt werden: In einer Jahre bis Jahrzehnte andauernden prädiabetischen Phase ist der Organismus in der Lage, die Insulinresistenz durch vermehrte Insulinsekretion auszugleichen. Während dieser Zeit ist die Insulinkonzentration im Serum erhöht. Die Blutglukose liegt dabei im Normbereich. Mit Fortschreiten der Erkrankung ist die Blutglukose postprandial erhöht (GROOP, 1999). Die Glukosetoleranz ist vermindert. Parallel dazu kommt es zu einem progressiven Verlust der β -Zellfunktion. Der manifeste Diabetes Mellitus ist erreicht, wenn die Insulinsekretion nicht mehr ausreicht, um die Blutglukose im Normbereich zu halten.

1.1.2 Insulinresistenz

1.1.2.a Definition

Insulinresistenz ist die Unfähigkeit einer definierten Menge Insulins, die Glukoseaufnahme und den Glukoseverbrauch in dem selben Maße zu erhöhen, wie dies in einer normalen Population der Fall wäre (LEBOVITZ, 2001).

Die Empfindlichkeit gegenüber dem Hormon Insulin ist herabgesetzt. („A normal dose produces less than a normal response“ (KAHN, 1978))

Der Begriff der Insulinresistenz wird auf verschiedenen Ebenen des Stoffwechselgeschehens verwendet: Neben dem Gesamtorganismus gilt er auch für ein mangelndes Ansprechen einzelner Organe oder Zellen auf Insulin.

1.1.2.b Betroffene Organe

Insulinresistenz manifestiert sich in Skelettmuskulatur, Leber, Fettgewebe (REAVEN, 1995) und in den pankreatischen β -Zellen (BODEN et al, 2002).

Die Skelettmuskulatur übernimmt quantitativ den Hauptanteil der insulinstimulierten Glukoseutilisation (DEFRONZO, 1988). Insulinresistenz in der Skelettmuskulatur tritt gemeinsam mit einer Abnahme von Glykogensynthese (SHULMAN, 2000) und oxidativer Glukoseutilisation (DEFRONZO, 1988) auf. Insulinresistenz des Fettgewebes resultiert in einer gesteigerten lipolytischen Fettsäurefreisetzung. In der Leber führt Insulinresistenz zur Erhöhung der hepatischen Glukoseproduktion.

Insulinresistenz führt also über vermehrte hepatische Produktion und verminderte muskuläre Utilisation zu einer Erhöhung der intravasalen Glukosekonzentration. Um dies zu verhindern erfolgt eine Erhöhung der pankreatischen Insulinsekretion. Stimuli für die Insulinsekretion sind neben Glukose und Aminosäuren auch eine akute Erhöhung der freien Fettsäuren (FFS) (PORKSEN et al, 2002).

1.1.3 Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und Lipidstoffwechsel

1.1.3.a Pathophysiologie der Insulinresistenz

Die molekularen Mechanismen die zur Insulinresistenz führen sind nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass Lipide bei der Pathogenese der Insulinresistenz eine Rolle spielen (RAVUSSIN et al, 2002; YU et al, 2002; ABADIE et al, 2001; KRAEGEN et al, 2001; THOMPSON et al, 2000; DRESNER et al, 1999; GRIFFIN et al, 1999; BODEN, 1997; TURINSKY et al, 1990).

RANDLE et al postulierten 1963, dass eine erhöhte Verfügbarkeit von FFS zu einer kompetitiven Hemmung der Glukoseoxidation führt (Abb. 1.1.3.a-1 / a). Der als „Glukose-Fettsäure-Zyklus“ bezeichnete Mechanismus beschreibt die Interaktion dieser beiden Substrate für die Energiegewinnung. Bei erhöhter Lipidverfügbarkeit werden bevorzugt Fettsäuren zur Energiegewinnung oxidiert. Die gesteigerte β -Oxidationsrate bewirkt eine Erhöhung intramitochondrialer Konzentrationen von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und $\text{NADH}+\text{H}^+$. Beide hemmen die Pyruvatdehydrogenase (PDH) und bewirken somit eine verminderte mitochondriale Glukoseoxidation. Die Glykolyse wird durch Hemmung der Phosphofruktokinase

inhibiert. Die Hemmung der Phosphofruktokinase wird durch die, aufgrund der gesteigerten Lipidoxidationsrate, erhöhten Citratspiegel vermittelt. Die Hemmung bewirkt einen Anstieg der Glukose-6-Phosphat- (G6P) Konzentration. Über negative Rückkopplung wird daraufhin die Hexokinase (HK) gehemmt. Eine verminderte HK-Aktivität konnte bei insulinresistenten Individuen nachgewiesen werden (KRUSZYNSKA et al, 1989; PENDERGRASS et al, 1998).

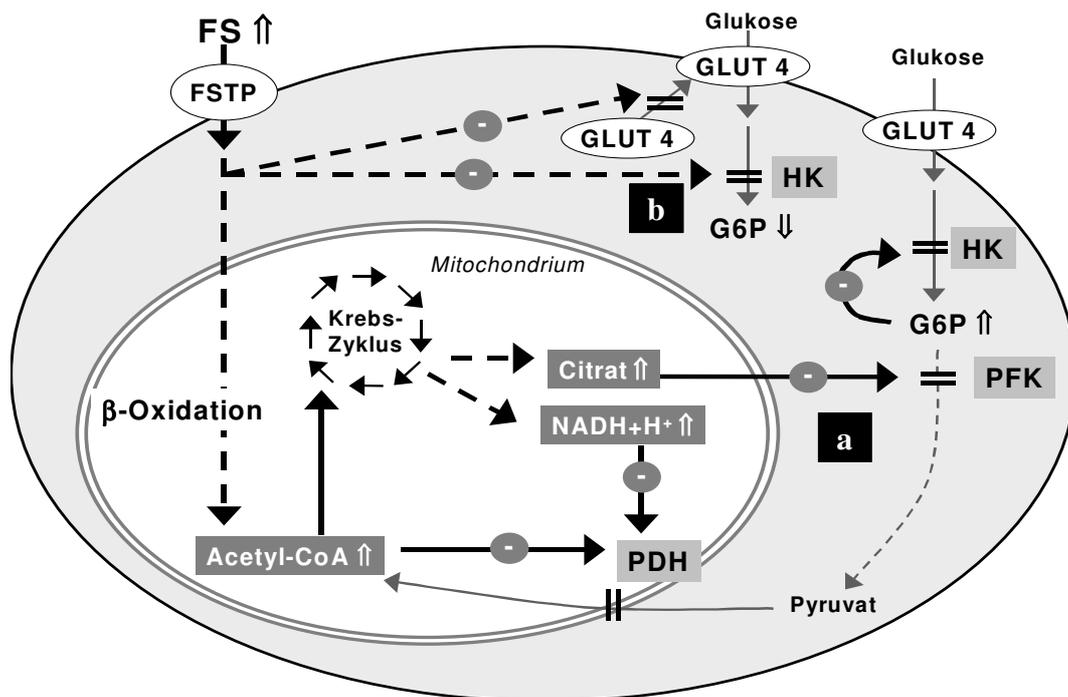


Abb. I.1.3.a-1 Hemmung des katabolen Glukosestoffwechsels durch Fettsäuren
a Glukose-Fettsäure-Zyklus nach RANDLE
 Durch gesteigerte β-Oxidation kommt es zu einer Erhöhung von intrazellulärem Acetyl-CoA, Citrat und NADH+H⁺. Diese Metaboliten hemmen die Pyruvatdehydrogenase (PDH) und die Phosphofruktokinase (PFK). Über ein negatives Feedback der erhöhten Glukose-6-Phosphat- (G6P) Konzentration wird die Hexokinase (HK) gehemmt (Diese Hypothese setzt eine erhöhte G6P-Konzentration voraus)
b Hemmung der HK und der Translokation des insulinabhängigen Glukosetransportproteins (GLUT 4) durch Fettsäuren (diese Modellvorstellung deckt sich mit der Tatsache, dass die G6P-Konzentration bei Insulinresistenz verringert ist)
FSTP: Fettsäuretransportprotein

Die HK kann, neben dem beschriebenen Weg, allerdings auch direkt durch aktivierte Fettsäuren (Long Chain Acyl Coenzyme A; LCACoA) inhibiert werden (THOMPSON et al, 2000). Dies führt sowohl zu einer verminderten Glukoseoxidation als auch zu einer Hemmung der Glykogenbildung (Abb. I.1.3.a-2 / c). Letztendlich gelangt in Folge der gehemmten intrazellulären Glukosephosphorylierung weniger

Glukose in die Zelle (RANDLE et al, 1963), was eine Erhöhung der intravasalen Glukosekonzentration nach sich zieht.

Die von Randle postulierte Substratkompetition, sowie die Hemmung der HK bewirken unabhängig von einer Stimulation durch Insulin eine verminderte Glukoseutilisation. Die insulinvermittelte Glukoseaufnahme in die Zelle ist nicht direkt gestört.

Der von Randle beschriebene Mechanismus zur Substratkompetition ist auf der Ebene mitochondrialer Adenosintriphosphat- (ATP) Gewinnung noch immer gültig. RODEN et al zeigten jedoch 1996, dass die intrazelluläre G6P-Konzentration bei lipidinduzierter Insulinresistenz verringert ist. Dies deutet entweder auf eine HK-Hemmung durch Fettsäuren (Abb. I.1.3.a-2 / c) oder auf die Hemmung eines der HK vorgelagerten Schrittes hin. Die Glukosephosphorylierung durch die HK stellt den ersten enzymatischen Schritt nach Aufnahme der Glukose in die Zelle dar. Die Hemmung von Glukosetransportproteinen (GLUT) durch Fettsäuren erscheint daher neben einer direkten HK-Hemmung als pathologischer Mechanismus wahrscheinlich.

SHULMAN entwickelte 2000 eine Hypothese, die eine direkte Interaktion von Fettsäuren mit der Insulinsignalkaskade postuliert (Abb. I.1.3.a-1 / b; Abb. I.1.3.a-2 / a). Das Phänomen der Insulinresistenz tritt vermehrt bei obesen Individuen auf. Eine Zunahme des Körpergewichts korreliert mit verminderter Insulinsensitivität (BODEN et al, 2002). Obese Menschen zeigen erhöhte Fettsäurespiegel im Blut (GORDON, 1960). Shulman postulierte eine direkt durch LCACoA's oder über die Bildung von Diacylglycerol (DAG) vermittelte Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Die Aktivierung von PKC hat eine Hemmung nachgeordneter Signalkaskaden zur Folge: Vermittelt durch die Phosphorylierung von Serin- (Ser) und Threonin- (Thr) Bindungsstellen an Insulin Rezeptor Substraten (IRS), kommt es zur Inhibition der Insulinsignalkaskade. Dies führt letztendlich zu einer Hemmung der insulinvermittelten Translokation des insulinabhängigen GLUT4 aus intrazellulären Vesikeln zur Zellmembran.

Über die Bildung von Ceramid aus aktivierten Fettsäuren wird nach SUMMERS (1998) die Proteinkinase B (PKB) gehemmt, was ebenfalls zu einer Hemmung der insulinstimulierten Translokation von GLUT4 zur Zellmembran führt (Abb. I.1.3.a-2 / b). Neue Studien beim Menschen zeigen, dass der muskuläre Ceramidgehalt bei Obesitas erhöht ist (ADAMS et al, 2004).

Beide Mechanismen führen durch direkte Blockade der Insulinsignalkaskade zu einer reduzierten Insulinwirkung, einer verminderten Glukoseaufnahme in die Zelle und somit zur Hyperglykämie. Letztere kann in frühen Stadien der Erkrankung durch eine kompensatorische Hyperinsulinämie verhindert werden.

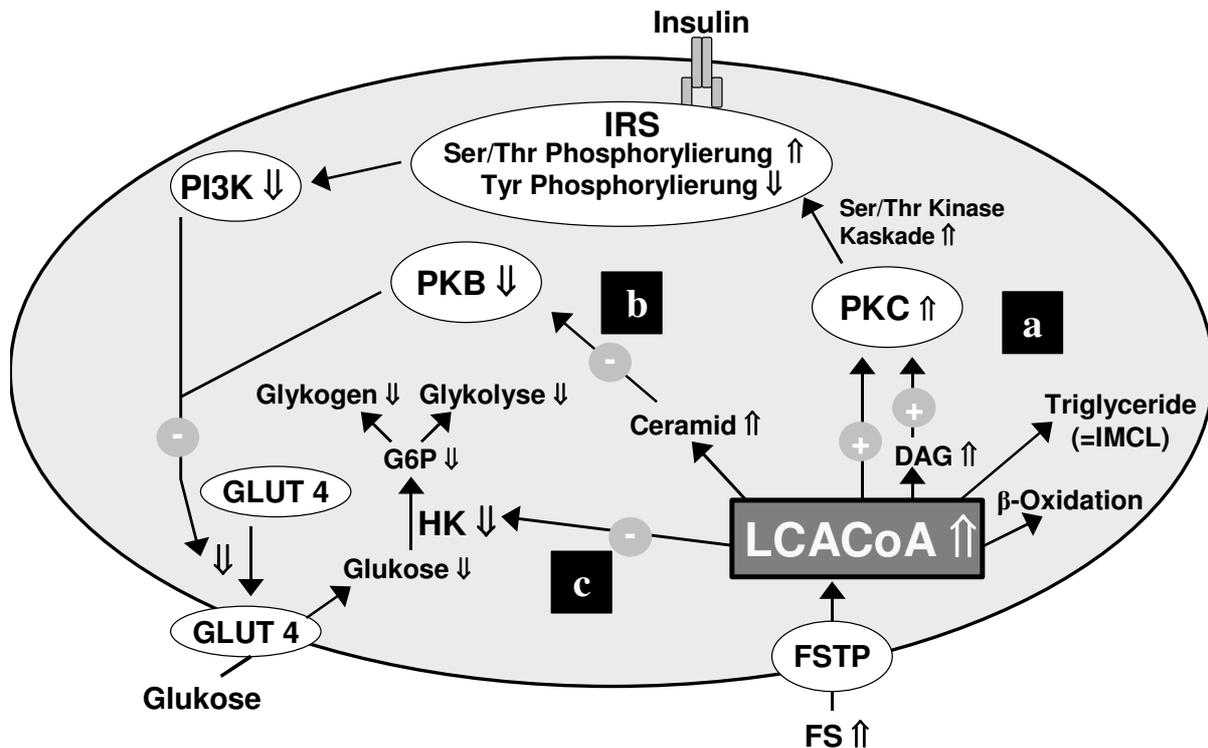


Abb. I.1.3.a-2 Mögliche Mechanismen der Lipid-induzierten Insulinresistenz in der Skelettmuskelzelle (FS: Fettsäure; FSTP: Fettsäuretransportprotein; IMCL: intramyozelluläres Lipid)

- a Vermittelt durch aktivierte Fettsäuren (LCACoA) oder Diacylglycerol (DAG) kommt es über die Proteinkinase C zur Aktivierung einer Serin-/Threonin-Kinase-Kaskade. Dies führt zur Phosphorylierung von Serin- (Ser) und Threonin- (Thr) Bindungsstellen an Insulin Rezeptor Substraten (IRS). Dadurch ist die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) vermindert. Dies resultiert in einer verminderten Translokation des Glukosetransporterprotein 4 (GLUT 4) zur Zellmembran und somit zu einer verminderten Glukoseaufnahme in die Zelle (SHULMAN, 2000).
- b Durch vermehrte Bildung von Ceramiden wird die Proteinkinase B (PKB) gehemmt. Auch dies führt zu einer verminderten Translokation von GLUT4 zur Zellmembran (SUMMERS, 1998).
- c LCACoA hemmen die Hexokinase (HK). Die Glukose-6-Phosphat- (G6P) Konzentration ist somit erniedrigt. Dadurch ist sowohl die Glykogenbildung als auch die Glykolyse gehemmt (THOMPSON, 2000).

1.1.3.b Rolle der LCACoA

Die in Kapitel (1.1.3.a) aufgeführten Postulate zur Pathogenese der Insulinresistenz bringen die LCACoA in eine Schlüsselposition. Es gibt Hinweise, dass nicht die LCACoA-Konzentration, sondern einzelne LCACoA-Spezies in besonderem Maß an der Entstehung der Insulinresistenz beteiligt sind.

Dabei rücken Palmitat sowie dessen aktivierte Form in den Mittelpunkt des Interesses: Diese Fettsäure hemmt die Glykogensynthase (KAUSCH et al, 2003; WITITSUWANNAKUL et al, 1977). Als essentieller Baustein von Ceramiden kann Palmitat die Insulinsignalkaskade beeinflussen. Eine palmitatabhängige Hemmung der insulinstimulierten Glukoseaufnahme ist an der isolierten Skelettmuskelzelle beschrieben (MONTELL et al, 2001).

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Analysen der LCACoA zeigten jedoch, dass die Konzentration einer anderen Fettsäure, der Palmitoleinsäure, bei Insulinresistenz erhöht ist. Auch zeigte diese Fettsäure in der Leber bei postabsorptiver Lipolyse eine von allen anderen LCACoA's abweichende Dynamik.

1.1.3.c Rolle des intramyozellulären Lipids (IMCL)

Insulinresistenz bedeutet „lipid in the wrong places“ (FRIEDMAN, 2002). Bei insulinresistenten Individuen können vermehrt Lipidablagerungen innerhalb der Muskelzelle beobachtet werden (KUHLMANN et al, 2003; SINHA et al, 2002, JACOB et al, 1999; KRSSAK et al 1999; PERSEGHIN et al, 1999; PAN et al, 1997).

Die als IMCL (intramyozelluläre Lipide) bezeichneten Lipide liegen in Form kleiner Droplets vor. Aufgrund deren Lage in der Nähe der Mitochondrien stellen sie eine direkt verfügbare Energiequelle dar (MASORO, 1967).

IMCL kann durch ¹H-NMR-Spektroskopie (Protonen-Kernspinspektroskopie; Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy) quantifiziert werden. Mit dieser Methode kann IMCL erstmals nichtinvasiv in vivo bestimmt werden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht in der exklusiven Bestimmung intramyozellulärer Lipide. Bei biochemischen Analysen besteht ein Teil des gemessenen Lipids immer aus adipozytären Triglyzeriden.

Obesitas ist durch exzessive Fettablagerung gekennzeichnet. Durch die große Menge an Fettgewebe ist die Gesamtmenge lipolytisch freigesetzter Fettsäuren im

Serum erhöht. Diese können von nicht-adipozytären Geweben wie Skelettmuskulatur oder Leber aufgenommen und als Triglyzeride in Form von IMCL und HepCL (hepatozelluläres Lipid) gespeichert werden. Eine experimentelle Erhöhung der FFS führt zu einer Erhöhung des IMCL (BODEN et al, 2001; Brechtel et al, 2001). Die Lipidspeicherung obeses Individuen ist somit nicht auf die Adipozyten beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf nicht-adipozytäre Gewebe.

Triglyzeride per se sind metabolisch relativ inert (UNGER et al, 2001). Daher scheinen IMCL und Insulinresistenz nur mittelbar eine kausale Verbindung zu haben. Aktuell wird die Akkumulation von Lipiden in der Skelettmuskelzelle als ein Surrogat für biochemische Prozesse diskutiert, welche die Insulinsensitivität der Muskelzelle herabsetzen (MCGARRY et al, 1999).

Eine Erhöhung von IMCL tritt nicht nur im Zusammenhang mit Insulinresistenz auf. IMCL ist bei Marathonläufern (SCHRAUWEIN-HINDERLING et al, 2003), präpubertär (NEUMANN-HÄFELIN et al, 2003 (Ratte)) und nach längerer Hungerphase (STANNARD et al, 2002 (Humandaten)) ebenfalls erhöht. Aufgrund der Altersabhängigkeit von IMCL erfolgten die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen bei Tieren unterschiedlicher Altersklassen.

Unterschiede in der IMCL-Konzentration konnten auch bei verschiedenen Muskelfasertypen beobachtet werden: Muskeln, die einen hohen Anteil an glykolytischen Fasern aufweisen, haben einen niedrigeren IMCL-Gehalt als Muskeln mit vornehmlich oxidativen Fasern (HWANG et al, 2001). Im Rahmen dieser Dissertation wurde der IMCL-Gehalt sowohl in glykolytischen als auch in oxidativen Muskeln bestimmt.

1.1.3.d Rolle des hepatozellulären Lipids (HepCL)

Die Rolle von HepCL bei der Pathogenese der Insulinresistenz ist weniger gut untersucht als diejenige des IMCL. Jedoch gibt es beim Menschen hinsichtlich dieser ektopischen Lipidablagerungen Hinweise auf einen Zusammenhang mit hepatischer Insulinresistenz (ANDERWALD et al, 2002; SEPPÄLÄ-LINDROOS et al, 2002; MARCEAU et al, 1999). Die in Verbindung mit Insulinresistenz gemessene HepCL-Konzentration liegt deutlich niedriger als bei Patienten mit klinischem Fettlebersyndrom (RYYSY et al, 2000).

Ebenso wie für die Analyse von IMCL steht mit der ¹H-NMR-Spektroskopie erstmals ein Verfahren zur Verfügung, HepCL nichtinvasiv zu quantifizieren.

I.2 Pharmakologische Beeinflussung von Typ 2 Diabetes

Zur Therapie von Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes gehören neben der pharmakologischen Intervention auch diätetische Maßnahmen sowie moderate körperliche Aktivität und Gewichtsreduktion (NATIONALE VERSORGUNGSLEITLINIE DIABETES MELLITUS TYP 2, 2003).

Da die Diagnose „Typ 2 Diabetes“ in der Regel erst im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung erfolgt, reichen die beschriebenen nicht-pharmakologischen Maßnahmen meist nicht aus. Eine pharmakologische Intervention wird notwendig.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Ausbruch des Diabetes bei insulinresistenten Ratten durch die Verabreichung von Metformin, Rosiglitazon oder einem Agonisten des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptors α (PPAR- α -Agonisten) verhindert. Der Erfolg der Diabetesprävention wurde, neben dem kontinuierlichen Monitoring verschiedener Serumparameter, durch Stimulation der adipozytären Lipolyse getestet.

I.2.1 Biguanide

Von dieser Substanzklasse ist nur ein Wirkstoff im Handel erhältlich: Metformin.

Diese Substanz, deren molekularer Wirkmechanismus nicht im Detail bekannt ist, senkt die endogene Glukoseproduktion (HUNDAL et al, 2000). Die Verbesserung der Insulinsensitivität durch Metformin wird diskutiert (CUSI et al, 1998). Eine weitere Wirkung von Metformin liegt in der Hemmung der enteralen Glukoseresorption (FORTH et al, 2001): Die Substanz reichert sich nach oraler Applikation in den Epithelzellen des Darmtraktes an. Dort wird über eine Hemmung der Atmungskette die Glukoseaufnahme verhindert. Neuste Untersuchungen in Zellkultur zeigen einen weiteren möglichen Wirkmechanismus: Metformin führt zur Aktivierung der Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase (AMPK). Dies führt zur Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) und zur Induktion der Fettsäureoxidation. Gleichzeitig wird die Expression lipogener Enzyme gehemmt (ZHOU et al, 2001).

Metformin gilt momentan bei adipösem Typ 2 Diabetes als Medikament der ersten Wahl (NATIONALE VERSORGUNGSLEITLINIE DIABETES MELLITUS TYP 2, 2003).

I.2.2 Sulfonylharnstoffe

Vertreter dieser Substanzklasse wirken primär über die Bereitstellung von Insulin. Dieser Effekt tritt jedoch auch bei niedrigen Blutglukose-Konzentrationen auf. Vermittelt durch diese Substanzen können daher Hypoglykämien ausgelöst werden. Sulfonylharnstoffe sind aufgrund ihres Wirkmechanismus außerdem auf funktionsfähiges Inselgewebe angewiesen. Da durch Anwendung von Präparaten dieser Substanzklasse eine Zunahme des Körpergewichts beobachtet wird, sind Sulfonylharnstoffe für die Therapie übergewichtiger Typ 2 Diabetiker als Langzeittherapie ungeeignet (NATIONALE VERSORGUNGSLEITLINIE DIABETES MELLITUS TYP 2, 2003).

I.2.3 α -Glukosidase-Inhibitoren

Die im Handel verfügbaren Substanzen Acarbose und Miglitol hemmen die enzymatische Spaltung von Disacchariden im Darm. Dadurch ist die Glukosefreisetzung aus der Nahrung verzögert, eine langsamere enterale Resorption ist die Folge. Extreme postprandiale Schwankungen der Blutglukose können so vermieden werden. Als Nebenwirkungen werden Meteorismus, Flatulenz und Diarrhö beschrieben. Die Verabreichung von α -Glukosidase-Inhibitoren erfolgt vor allem bei Patienten, bei denen über andere therapeutische Maßnahmen kein ausreichender Behandlungserfolg zu erzielen ist (NATIONALE VERSORGUNGSLEITLINIE DIABETES MELLITUS TYP 2, 2003).

I.2.4 PPAR-Agonisten

PPAR-Agonisten (PPAR: Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor) sind eine relativ neue Möglichkeit zur pharmakologischen Beeinflussung von Typ 2 Diabetes. Aufgrund ihrer insulinsensitivierenden Wirkung stellt diese Substanzklasse einen kausalen Therapieansatz dar.

Die PPAR gehören zur Familie der nukleären Steroid-Rezeptoren. Steroid-Rezeptoren sind spezifische Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, mit deren Hilfe Liganden Einfluss auf die Proteinsynthese nehmen. Bisher konnten 3 Hauptvertreter der PPAR identifiziert werden: α , γ und δ (LEMBERGER et al, 1996). Eicosanoide werden als Liganden von PPAR- α diskutiert. Als natürliche Liganden von PPAR- δ gelten Fettsäuren. Prostaglandine und Thromboxane werden als Liganden für alle Rezeptortypen diskutiert (MATTHAEI et al, 2001). PPAR- α -

Agonisten befinden sich als „Lipidsenker“, PPAR- γ -Agonisten als „Insulinsensitizer“ im Handel.

Die Aktivierung des Rezeptors erfolgt durch Bindung eines Liganden. Der aktivierte Rezeptor bildet ein Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor. Dieser Rezeptorkomplex bindet an das Peroxisomen-Proliferator Responsive Element (PPRE) in der Promotor-Region verschiedener Gene, welche durch Insulin reguliert sind (VERSPOHL et al, 2002). Dadurch wird die Expression spezifischer PPAR-abhängiger Gene induziert (DESVERGNE et al, 1999). Die Aktivierung von PPAR- α verbessert dabei den katabolen Lipidmetabolismus. Eine PPAR- γ -Aktivierung dagegen führt zu einer gesteigerten Triglyzeridspeicherung, verbessert also den anabolen Lipidstoffwechsel.

1.2.4.a PPAR- γ -Agonisten (Thiazolidindione)

PPAR- γ wird primär im Fettgewebe exprimiert. Eine geringe Expression ist in Leber und Skelettmuskulatur zu finden.

Die Hauptwirkung von Agonisten dieses Rezeptors ist, entsprechend dem Hauptexpressionsort, im Fettgewebe zu finden. Dort kommt es durch PPAR- γ -Aktivierung zur Neubildung maturer Adipozyten aus Präadipozyten (OKUNO et al, 1998). Die neugebildeten Adipozyten besitzen ein erhöhtes Potential zur Lipidspeicherung (DE SOUZA et al, 2001). Über eine PPAR- γ vermittelte verstärkte Expression lipogener Enzyme führt eine Behandlung mit PPAR- γ -Agonisten zu einer Umverteilung der Lipide aus nicht-adipozytären Geweben ins Fettgewebe. Dies ist, ohne gleichzeitige strenge diätetische Maßnahmen, verbunden mit einer deutlichen Erhöhung des Körpergewichts.

Eine Therapie mit Thiazolidindionen resultiert in einer Verbesserung der Blutglukosehomöostase (JUCKER et al, 2002, SREENAN et al, 1996) sowie in einer Absenkung der Triglyzerid- und Fettsäurespiegel im Serum (IDE et al, 2000; OLEFSKY, 2000; UPTON et al, 1998).

Als Vertreter dieser Substanzklasse sind in Deutschland Rosiglitazon und Pioglitazon seit Mitte 2000 zur oralen Behandlung von Typ 2 Diabetes zugelassen. Die Zulassung ist auf die Kombinationstherapie mit Metformin oder Sulfonylharnstoffen beschränkt.

1.2.4.b PPAR- α -Agonisten

PPAR- α wird in den meisten Organen exprimiert. Hauptexpressionsorgan ist jedoch die Leber. Eine Aktivierung des Rezeptors führt zu einer gesteigerten β -Oxidation sowie zur Reduktion von Triglyzeridsynthese und -freisetzung (STAELS et al, 1998). Dies geschieht über die Modifikation des Expressionsprofils von Genen, welche in den Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel involviert sind. Studien an insulinresistenten Ratten zeigen darüber hinaus eine insulinsensitivierende Wirkung stark wirksamer PPAR- α -Agonisten (YE et al, 2001).

Mit den Fibraten sind schwach wirksame PPAR- α -Agonisten als synthetische Liganden zur Behandlung von Hypertriglyzeridämie im Handel (Clofibrat, Fenofibrat, Bezafibrat und Gemfibrozil). Eine Verbesserung der Insulinsensitivität durch diese Substanzen konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Mittlerweile stehen jedoch stärker wirksame PPAR- α -Agonisten zur Verfügung, mit denen die Wirkung auf die Insulinsensitivität getestet werden kann. Aufgrund des beschriebenen Wirkmechanismus ist eine Steigerung der Insulinsensitivität durch diese Substanzen zu erwarten.

Die Aktivierung von PPAR- α zur Verbesserung der Insulinsensitivität stellt somit ein neues potentiell Indikationsgebiet dieser Substanzklasse dar.

1.2.5 Insulin

Die Behandlung mit Insulin erfolgt bei Typ 2 Diabetikern erst nach Ausschöpfen aller anderen therapeutischen Möglichkeiten. Sie dient der Substitution von Insulin bei Nachlassen der pankreatischen Sekretion.

I.3 Lipidstoffwechsel unter postabsorptiven Stoffwechselbedingungen

In der frühen postabsorptiven Phase sinkt aufgrund der fehlenden enteralen Glukosezufuhr zunächst die Blutglukose bis auf den Nüchternglukosespiegel ab. Der nun fehlende Stimulus von Glukose auf die Insulinsekretion führt sodann zu sinkenden Insulinspiegeln. Gleichzeitig wird die Ausschüttung von Glukagon stimuliert, was eine Entleerung der Glykogenspeicher zur Folge hat. Hier spielt die Leber eine große Rolle: Dieses Organ trägt aufgrund seiner Glukose-6-Phosphatase-Aktivität maßgeblich zur Glukosehomöostase bei. Bei den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Analysen konnte bei Wistar-Ratten bereits nach 12-stündiger Nahrungskarenz eine nahezu vollständige Entleerung der hepatischen Glykogenspeicher nachgewiesen werden.

Durch den niedrigen Insulinspiegel ist dessen antilipolytische Wirkung auf das Fettgewebe vermindert. Die Expression von PPAR- γ ist im Fettgewebe unter postabsorptiven Bedingungen vermindert (SHIMOIKE et al, 1998). FFS werden in die Blutbahn abgegeben (CAHILL et al, 1968). Diese Fettsäuren dienen der Energieversorgung peripherer Gewebe. Postabsorptiv deckt der Organismus seinen Energiebedarf zunehmend durch Lipidoxidation. In der Leber resultiert die erhöhte β -Oxidationsrate in einem Mangel an oxidierten wasserstoffübertragenden Coenzymen für den Zitratzyklus. Lipide werden nur vermindert vollständig oxidativ abgebaut. Die Leber ist somit zur Ketonkörperproduktion gezwungen.

Neben der gesteigerten Lipidoxidation kommt es unter postabsorptiven Bedingungen auch zu einer Hemmung des anabolen Lipidstoffwechsels. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Hemmung der hepatischen Triglyzeridsynthese unter postabsorptiven Bedingungen über eine verminderte Expression von PPAR- γ in der Leber vermittelt wird (HERZIG et al, 2003).

Durch die Energiegewinnung aus Lipiden wird die bereitgestellte Glukose für die Versorgung von Nervensystem, Erythrozyten und Nierenmark aufgespart. Die Glukosebereitstellung für die obligaten Glukoseverwerter erfolgt nach Ausschöpfen der Glykogenreserven durch hepatische und, in geringerem Maße, renale Glukoneogenese. Die Synthese erfolgt aus Glycerin und Laktat sowie über den Abbau glukogener Aminosäuren.

Mit fortschreitender Dauer der postabsorptiven Periode kommt es in extrahepatischen Geweben zunehmend zur Verwertung von Ketonkörpern für die

Energiegewinnung. Diese entstehen zum einen aus der glukagonvermittelten, gesteigerten hepatischen β -Oxidation, zum anderen, mit zunehmender Dauer der postabsorptiven Periode, aus dem Abbau ketogener Aminosäuren. Die Ketogenese wird durch die unter postabsorptiven Bedingungen erhöhte PPAR- α -Aktivität weiter stimuliert (KERSTEN et al, 1999; RODRIGUEZ et al, 1994).

Die postabsorptive Energiegewinnung durch Lipidoxidation beeinflusst auch den Triglyzeridgehalt in der Muskelzelle. Biochemische Analysen erbrachten dabei gegensätzliche Resultate: Eine Studie beschreibt einen Anstieg des Triglyzeridgehaltes infolge der Nahrungskarenz (MASORO 1967). In einer anderen Veröffentlichung wird dagegen unter postabsorptiven Bedingungen von einer 50%-igen Abnahme des muskulären Triglyzeridgehaltes berichtet (JAROMOWSKA et al, 1985). Die in vivo ^1H -NMR-Spektroskopie bietet eine neue Möglichkeit, muskuläre Triglyzeride zu bestimmen. Der Vorteil dieser Methode liegt in der ausschließlichen Analyse intramyozellulärer Lipide ohne den störenden Einfluss perimyozellulärer, adipozytärer Triglyzeride. Letztere stellen bei biochemischen Analysen eine nicht zu vermeidende Fehlerquelle dar. Aufgrund der postabsorptiv erhöhten Lipidoxidationsrate wurde, bei den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen, ein Absinken von IMCL erwartet. Die Resultate zeigten jedoch das Gegenteil: Bei allen Studien konnte ein IMCL-Anstieg in glykolytischen Muskeln beobachtet werden.

Zwischen dem Phänomen der Insulinresistenz und der postabsorptiven Stoffwechselsituation bestehen hinsichtlich von Lipid- und Glukosestoffwechsel viele Gemeinsamkeiten: Beide Stoffwechselsituationen beschreiben die Energiegewinnung ohne den Einfluss von Insulin. Sowohl postabsorptiv als auch bei Insulinresistenz / Diabetes kommt es zur gesteigerten adipozytären Lipolyse. Durch Verlängerung der postabsorptiven Periode kann eine chronische Erhöhung der FFS, wie sie bei insulinresistenten / diabetischen Individuen vorliegt, simuliert werden. In beiden Situationen kommt es außerdem zur Erhöhung der hepatischen Glukoseproduktion.

Ob durch Nahrungskarenz experimentell eine Insulinresistenz im Gesamtorganismus erzeugt werden kann, ist umstritten. Während bei Studien an Wistar-Ratten keine Änderung der Insulinsensitivität in Abhängigkeit von der Dauer des Nahrungsentzuges festgestellt werden konnte (YOUN et al, 1993; KRUSZYNSKA et al, 1989), vermindert eine 48-stündige Nahrungskarenz beim

Menschen die Glukoseaufnahme in die peripheren Gewebe (WEBBER et al, 1994; MANSELL et al, 1990).

I.4 Problemstellung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte eine pharmakologische Charakterisierung eines neuen PPAR-Agonisten (PPAR- α) durchgeführt werden. Der Schwerpunkt sollte in der Untersuchung seiner Potenz als Insulinsensitizer und Antidiabetikum mit primärer Wirkung auf den Lipidstoffwechsel liegen. Die pharmakologische Charakterisierung erfolgte im Vergleich zu Metformin und Rosiglitazon als Referenzsubstanzen.

Neben dieser Charakterisierung beinhalteten die Studien Untersuchungen zur engen Verzahnung zwischen Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel bei Insulinresistenz unter postprandialen (erhöhte Kohlenhydratoxidation) und postabsorptiven (erhöhte Lipidoxidation) Bedingungen während einer 72-stündigen nahrungskarenten Phase. Als „postabsorptive Phase“ wird im Rahmen dieser Dissertation der gesamte Zeitraum des Nahrungsentzuges bezeichnet.

Hierzu wurden Untersuchungen an insulin sensitiven, insulinresistenten nicht diabetischen und an diabetischen Ratten durchgeführt. Im Rahmen dieser Studien wurde der Zusammenhang zwischen Lipidstoffwechsel und Insulinresistenz durch biochemische Analysen und ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchungen näher untersucht.

I.4.1 Analysen

Die durchgeführten Studien beschreiben zum einen die bekannten metabolischen Veränderungen unter postabsorptiven Bedingungen. Dafür wurden die relevanten Parameter im Blutserum analysiert.

Außerdem wurden Analysen von Parametern durchgeführt, die an der Pathogenese der Insulinresistenz beteiligt sein sollen:

I.4.1.a intrazelluläre Lipide

Intrazelluläre, nicht-adipozytäre Lipide dienen als Surrogatparameter für Insulinresistenz im entsprechenden Organ. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen sollten die Rolle von IMCL und HepCL unter postabsorptiven Bedingungen aufzeigen. Die intrazellulären Lipidkonzentrationen wurden in der Leber und in drei verschiedenen Muskeln (M. Tibialis Anterior (TIB), M. Extensor Digitorum Longus (EDL), M. Soleus (SOL)) bestimmt. Die Muskeln unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Fasertypzusammensetzung: Während TIB vorwiegend aus glykolytischen Fasern besteht, besitzt SOL eine hohe oxidative Kapazität. EDL enthält sowohl oxidative als auch glykolytische Faseranteile.

I.4.1.b LCACoA

Die LCACoA sollen eine kausale Rolle bei der Pathogenese der Insulinresistenz spielen. Welchen Veränderungen sie im normalen postabsorptiven Stoffwechsel unterworfen sind, und ob daraus ein Zusammenhang mit dem Phänomen der Insulinresistenz abzuleiten ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden.

Es sollte außerdem untersucht werden, ob das Phänomen der Insulinresistenz mit einzelnen LCACoA-Spezies in Verbindung gebracht werden kann.

Die Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse verschiedener LCACoA-Spezies wurde im Rahmen dieser Arbeit für Skelettmuskulatur und Leber validiert. Für die Analytik der LCACoA in der Skelettmuskulatur wurde mit dem M. Longissimus Dorsi (LONG) ein glykolytischer Muskel gewählt.

I.4.1.c Malonyl-CoA

Malonyl-CoA ist der endogene Inhibitor der Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1 (CPT-1), dem Transporter von Fettsäuren durch die äußere Mitochondrienmembran. Die Fettsäureoxidationsrate wird somit von Malonyl-CoA reguliert. Im Rahmen dieser Studien diente Malonyl-CoA als Marker für die Lipidoxidation.

I.4.2 Strukturierung der Dissertation

Die Ergebnisse jeder Studie zeigen zunächst bekannte Stoffwechselfparameter unter postabsorptiven Bedingungen (Körpergewicht, Blutglukose, Insulin, Triglyzeride, FFS, Ketonkörper). Es folgen Parameter, die mit Insulinresistenz und dem Lipidstoffwechsel in Zusammenhang stehen (IMCL, HepCL, Malonyl-CoA, LCACoA), oder für die Validierung der durchgeführten Methoden (Gesamt-Kreatin (tCr), Lebergewicht, Glykogengehalt der Leber, Wassergehalt der Leber) erforderlich waren.

Im Anhang (Kapitel VIII) sind Ergebnisse von Analysen aufgeführt, die im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation oder durch Auftragslabors durchgeführt wurden. Diese Daten beschreiben das Fettsäuremuster in verschiedenen Geweben (Fraktion der FFS im Blut, subkutanes und viszerales Fettgewebe) und im Futter. Die Daten stellen eine Ergänzung der LCACoA-Analysen dar. Sie zeigen die Dynamik der Lipide bei adipozytärer Lipolyse vom Fettgewebe über das Blut hin zu Skelettmuskulatur und Leber.

Weitere im Anhang aufgeführte Daten dienen der Bestätigung der in der Literatur beschriebenen Faserzusammensetzung der untersuchten Muskeln. Eine Charakterisierung der oxidativen Kapazität ist nach unserem Kenntnisstand für das Modell der Zucker Diabetic Fatty (ZDF) -Ratte bisher nicht beschrieben. Die Kenntnis des Fasertyps ist für die Interpretation der IMCL-Daten unerlässlich.

I.4.3 Wichtigste Resultate

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte eine rasche Dynamik des IMCL nachgewiesen werden. Diese Dynamik war in Abhängigkeit der oxidativen Kapazität des untersuchten Muskels unterschiedlich ausgeprägt.

Die beobachtete Erhöhung von IMCL bei hohen intravasalen FFS-Konzentrationen scheint ein protektiver Mechanismus zur Vermeidung hoher intramyozellulärer LCACoA-Konzentrationen zu sein. Dieser Mechanismus scheint bei insulinresistenten und diabetischen Tieren gestört zu sein.

In der Leber trat eine Erhöhung des HepCL ausschließlich bei insulinresistenten Tieren auf. Der Anstieg der LCACoA-Konzentration unter postabsorptiven Bedingungen wurde in der Leber nicht verhindert.

Die Diabetesprävention mit dem PPAR- α -Agonisten bewirkte die Senkung von IMCL und HepCL unter gefütterten Bedingungen. Postabsorptiv stiegen beide Parameter überproportional stark an. Trotz dieses Anstiegs konnte die LCACoA-Konzentration im LONG auf niedrigem Niveau gehalten werden.

Die Analyse der LCACoA führte zu einem weiteren wichtigen Ergebnis: Die Konzentration von C16:1 war bei allen obesen ZDF-Ratten erhöht. C16:1 entsteht ausschließlich durch endogene Synthese. Die Hemmung des hierfür benötigten Enzyms (Stearoyl-CoA-Desaturase, SCD) wird aktuell als potentiell Zielprotein für die Entwicklung neuer antidiabetisch wirksamer Substanzen diskutiert.

II Material und Methoden

II.1 Versuchstiere

II.1.1 Tiermodelle

Für die Studien wurden männliche Wistar-Ratten im Alter von 16 Wochen und männliche schlanke und obese ZDF-Ratten im Alter von 8 und 16 Wochen verwendet.

II.1.1.a Wistar-Ratte

Den Ursprung dieser Tiere stellt die braune Ratte (*Rattus norvegicus*) dar. Aus deren Albinoförmigkeit wurde zu Beginn des 20. Jahrhunderts die Wistar-Ratte gezüchtet (KRINKE, 2000).

Der verwendete Stamm (HsdCpb:WU) wurde von der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Es handelt sich um einen Auszuchtstamm. Durch die breite genetische Variabilität ausgezuchteter Tierstämme wird die Situation in Humanpopulationen imitiert (KRINKE, 2000).

II.1.1.b Zucker Diabetic Fatty-Ratte

Die ZDF-Ratte dient als Tiermodell zur Erforschung des humanen Typ 2 Diabetes.

Den genetischen Hintergrund bildet die Zucker Fatty (ZF) -Ratte, welche als Tiermodell für Insulinresistenz und Obesitas verwendet wird. Die ZF-Ratte entstand spontan bei der Kreuzung von Sherman- und Merck Stamm M Ratten (ZUCKER, 1965). Diese Ratten haben einen Defekt in der extrazellulären Domäne des Leptin-Rezeptors (TAKAYA et al, 1996). Der Defekt dieses „fa-Gens“ wird autosomal rezessiv vererbt (KARASIK et al, 1985). Homozygote (fa/fa) Tiere sind hyperphag, insulinresistent und extrem obese.

Aus einzelnen obesen ZF-Ratten, welche spontan diabetisch waren, wurde die ZDF-Ratte als Inzuchtstamm herausgezüchtet. Diese Inzuchtlinie war 1985 etabliert (ZDF/Gmi-fa/fa).

Das Tiermodell zeigt, ebenso wie der humane Typ 2 Diabetiker, sowohl das Phänomen der Insulinresistenz als auch dessen inadäquate Kompensation durch die pankreatischen β -Zellen (GRIFFEN et al, 2001).

Zwei unabhängig voneinander vererbte Defekte sind für den Phänotyp verantwortlich: Zum einen liegt bei den obesen Tieren der, auf den ZF-„Background“ zurückzuführende, Leptinrezeptordefekt vor. Zum anderen zeigen sowohl die schlanken als auch die obesen ZDF-Ratten einen Defekt in der A2-C1-E1-Region des Insulin-Genpromotors. Dieser Defekt resultiert in verminderten mRNA-Konzentrationen. Bei den schlanken Ratten kann der Defekt posttranskriptional kompensiert werden. Nur die Kombination aus Leptinrezeptordefekt und β -Zell-Genexpressionsdefekt kann den Phänotyp eines Typ 2 Diabetes hervorrufen (GRIFFEN et al, 2001).

Männliche homozygote (fa/fa) Tiere der ZDF-Ratte werden spontan diabetisch. Ab der 7. Lebenswoche beginnt sich eine Hyperglykämie zu manifestieren. Zwischen der 7. und der 12. Lebenswoche zeigen die Tiere erhöhte Insulinspiegel im Blut. Ab einem Alter von 12 Wochen werden die Tiere insulindefizient.

Heterozygote Tiere (fa/+) und homozygot schlanke Tiere (+/+) unterscheiden sich phänotypisch nicht voneinander. Sie sind schlank und insulin sensitiv. Diese Tiere (+/?) wurden im Rahmen dieser Arbeit als Kontrolltiere verwendet.

Die Tiere wurden von Charles River Laboratories (Wilmington, USA) bezogen.

II.1.2 Haltung der Tiere

Die Versuchstiere wurden paarweise auf Standardeinstreu für Labortiere in Makrolonkäfigen (Größe 4) untergebracht. Die Raumtemperatur betrug 20°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55%. Die Hell-Dunkel-Phasen wechselten in 12-stündigem Rhythmus.

II.1.3 Fütterung der Tiere

Die Tiere wurden ad libitum mit der „SSNIFF[®] R/M-H Alleindiät für Ratten und Mäuse – Haltung“ der Firma SSNIFF[®] (Soest, Deutschland) gefüttert. Das Futter enthält 19% Rohprotein, 3% Rohfett, 5,2% Rohfaser sowie 6,7% Rohasche. Die Versuchstiere hatten stets freien Zugang zu Trinkwasser.

II.2 Testsubstanzen

Zur Prävention von Typ 2 Diabetes wurden verschiedene Substanzen getestet. Metformin und Rosiglitazon dienten dabei als Referenz für den PPAR- α -Agonisten.

II.2.1 Metformin

Metformin (1,1-Dimethyl-Biguanid) zählt zur Klasse der Biguanide. Die Substanz wurde von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) als Reinsubstanz bezogen.

Die Verabreichung erfolgte über das Trinkwasser in einer Dosierung von 400 mg / kg KGW und Tag.

II.2.2 PPAR- γ -Agonist (Rosiglitazon)

Rosiglitazon, welches sich unter dem Namen Avandia[®] (GlaxoSmithKline (München, Deutschland)) im Handel befindet, wurde in Tablettenform bezogen.

Die Verabreichung erfolgte nach Pulverisieren der Tabletten durch Einmischung ins Futter in einer Dosierung von 3 mg Rosiglitazon / kg KGW und Tag.

II.2.3 PPAR- α -Agonist

Bei dem getesteten PPAR- α -Agonisten handelt es sich um eine Testsubstanz der Firma Aventis Pharma Deutschland GmbH.

Die Substanz wurde ebenfalls über Einmischung ins Futter verabreicht. Die Dosierung betrug 1 mg / kg KGW und Tag.

II.3 Studiendesign

Die durchgeführten Studien beinhalteten ein fünftägiges Versuchsprotokoll. Die Untersuchungen des ersten Tages ergaben Kontrollwerte an gefütterten Tieren.

Nach den Untersuchungen des ersten Tages wurde den Tieren das Futter entzogen. Die Ratten hatten weiterhin uneingeschränkten Zugang zu Trinkwasser.

Die Untersuchungen an den Tagen 2, 3 und 4 der jeweiligen Studie lieferten Werte von Tieren, welche seit 24, 48 und 72 Stunden nüchtern waren.

Nach der 72-stündigen postabsorptiven Periode wurde den Tieren Futter ad libitum angeboten, so dass die Untersuchungen des fünften Versuchstages die Stoffwechselsituation der Tiere nach 24-stündiger Wiederanfütterung beschrieben.

Alle Untersuchungen wurden unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

II.3.1 Studie bei 16 Wochen alten Wistar-Ratten (Abb. II.3-a)

II.3.1.a *Bestimmung des intrazellulären Lipidgehaltes mittels ¹H-NMR-Spektroskopie (NMR-Gruppen)*

Bei dieser Studie wurden an 5 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils die selben 8 Tiere im Rahmen des oben beschriebenen Versuchsprotokolls untersucht (intraindividuelle Studie).

Bei weiteren 8 Tieren wurde der Tag-Nacht-Rhythmus 2 Wochen vor Versuchsbeginn geändert. Den Tieren wurde am Vorabend des Versuches zu Beginn der Helligkeitsphase die Nahrung entzogen. Da Ratten nachtaktive Tiere sind und vor allem in Phasen der Dunkelheit Futter aufnehmen, hatten diese Tiere bei Futterentzug soeben die Zeit der Nahrungsaufnahme hinter sich gebracht. Somit waren die Ratten bei der Messung am nächsten Vormittag seit 12 h nüchtern.

Es wurde der IMCL-Gehalt in TIB, EDL und SOL ermittelt. Bei weiteren 8 Tieren wurde der HepCL-Gehalt mittels ¹H-NMR-Spektroskopie gemessen.

Bei den 3 Gruppen erfolgte zu jedem Messzeitpunkt eine Blutentnahme zur Bestimmung metabolischer Parameter.

II.3.1.b Bestimmung biochemischer Parameter in Skelettmuskulatur und Leber (Satellitengruppen)

Bei je 8 Tieren je Messzeitpunkt (SAT I und II) erfolgte unter Isofluran-Narkose eine terminale Blutentnahme zur Bestimmung metabolischer Parameter. Außerdem wurden die Leber, ein Aliquot des LONG und beiderseits TIB, EDL und SOL zur biochemischen Analyse entnommen (interindividuelle Studie).

II.3.2 Studie bei 8 Wochen alten ZDF-Ratten (Abb. II.3-b)

II.3.2.a Bestimmung des intrazellulären Lipidgehaltes mittels ¹H-NMR-Spektroskopie (NMR-Gruppe)

Diese Studie erfolgte mit je 8 obesen und 8 schlanken ZDF-Ratten. Die Studie wurde als intraindividuelle Studie durchgeführt.

Die Tiere durchliefen das 5-tägige Studienprotokoll. Bei beiden Gruppen wurden täglich der IMCL- (TIB, EDL, SOL) sowie der HepCL-Gehalt bestimmt.

Es erfolgten tägliche Blutentnahmen zur Analyse metabolischer Parameter.

Die genaue Aufstellung der verwendeten Tiergruppen ist der Abb. II.3-b zu entnehmen.

II.3.2.b Bestimmung biochemischer Parameter in Skelettmuskulatur und Leber (Satellitengruppe)

Für die Bestimmung biochemischer Parameter in Skelettmuskulatur und Leber erfolgte je Messzeitpunkt bei 8 schlanken und 8 obesen Tieren unter Isofluran-Narkose eine terminale Blutentnahme zur Bestimmung metabolischer Parameter. Außerdem wurden die Leber sowie ein Aliquot des LONG und beiderseits TIB, EDL und SOL entnommen (interindividuelle Studie).

Studiendesign: Wistar-Ratten

Versuchstiere: männliche Wistar Ratten (HsdCpb:WU)

5-Tage-Studiendesign: gefüttert, 12 h postabsorptiv, 24 h postabsorptiv, 48 h postabsorptiv, 72 h postabsorptiv, angefüttert

12 h postabsorptiv: umgedrehter Tag-Nacht-Zyklus

NMR-Gruppen: gefüttert, 24 h, 48h, 72h, angefüttert: n=8,
(intraindividuelle Studie) 12 h: n=8

Satellitengruppen: gefüttert (n=8), 12 h (n=8), 24 h (n=8), 48 h (n=8),
(interindividuelle Studie) 72 h (n=8), angefüttert (n=8)

**Alter zum Zeitpunkt der
Postabsorptionsstudie:** 16 Wochen (O)

Alter (Wochen): 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 (16)

NMR-Gruppen IMCL: SOL, TIB, EDL HepCL:	gefüttert → angefüttert (n=8)	IMCL
	gefüttert → angefüttert (n=8)	HepCL
	12 h (n=8)	HepCL+IMCL
Satellitengruppen I: <u>Muskelparameter:</u> tCr (SOL, TIB, EDL) Malonyl-CoA (SOL, TIB, EDL) LCACoA (LONG) <u>Leberparameter:</u> Malonyl-CoA LCACoA II: <u>Leberparameter:</u> Lebergewicht Trockenmasse Glykogen Triglyzeride	gefüttert → angefüttert (n=5x8)	I + II
	12 h postabsorptiv (n=8)	I + II

Blutparameter: Glukose, Insulin, Triglyzeride, FFS, Ketonkörper

Abb. II.3-a Studie bei 16 Wochen alten Wistar-Ratten. Die Abbildung zeigt die für die Messung der verschiedenen Parameter verwendeten Tiergruppen.

II.3.3 Studie bei 16 Wochen alten ZDF-Ratten (Abb. II.3-b)

II.3.3.a Bestimmung des intrazellulären Lipidgehaltes mittels ¹H-NMR-Spektroskopie (NMR-Gruppe)

Im Rahmen des 5-tägigen Versuchsprotokolls wurden bei 8 schlanken und 8 obesen ZDF-Ratten täglich der IMCL-Gehalt in TIB, EDL und SOL sowie der HepCL-Gehalt bestimmt.

An jedem der 5 Messzeitpunkte wurde außerdem eine Blutentnahme zur Analyse metabolischer Plasmaparameter durchgeführt.

Die genaue Einteilung der verwendeten Tiergruppen ist Abb. II.3.b zu entnehmen.

II.3.3.b Bestimmung biochemischer Parameter in Skelettmuskulatur und Leber (Satellitengruppe)

Bei einer Gruppe von je 8 schlanken und 8 obesen ZDF-Ratten erfolgte unter Isofluran-Narkose eine terminale Blutentnahme zur Bestimmung metabolischer Parameter. Bei diesen Tieren wurden außerdem die Leber sowie ein Aliquot des LONG und beidseitig TIB, EDL und SOL entnommen.

Studiendesign: ZDF-Ratten (unbehandelte Kontrolle)

Versuchstiere: männliche schlanke (—) und obese (■) ZDF Ratten (+/?, fa/fa Gmi)

5-Tage-Studiendesign: gefüttert, 24 h postabsorptiv, 48 h postabsorptiv, 72 h postabsorptiv, angefütert

NMR-Gruppen: gefüttert, 24 h, 48h, 72h, angefütert: n=8,
(intraindividuelle Studie)

Satellitengruppen: gefüttert (n=8), 24 h (n=8), 48 h (n=8), 72 h (n=8), angefütert (n=8)
(interindividuelle Studie)

Alter zum Zeitpunkt der Postabsorptionsstudie: 8 und 16 Wochen (○)

Alter (Wochen):

1 2 3 4 5 6 7 **8** 9 10 11 12 13 14 15 **16**

NMR-Gruppen (IMCL; HepCL)

IMCL:
SOL, TIB, EDL

HepCL:

gefüttert → angefütert (n=8) **IMCL**

gefüttert → angefütert (n=8) **HepCL** **HepCL**

gefüttert → angefütert (n=8) **IMCL**

gefüttert → angefütert (n=8) **HepCL+IMCL** **HepCL**

gefüttert → angefütert (n=8) **IMCL**

Satellitengruppen (SAT)

Muskelparameter:

tCr
(SOL, TIB, EDL)
Malonyl-CoA
(SOL, TIB, EDL)
LCACoA (LONG)

Leberparameter:

Malonyl-CoA
LCACoA

gefüttert → angefütert (n=5x8)

gefüttert → angefütert (n=5x8)

gefüttert → angefütert (n=5x8)

gefüttert → angefütert (n=5x8)

Blutparameter: Glukose, Insulin, Triglyzeride, FFS, Ketonkörper
(NMR- und Satellitengruppen)

Abb. II.3-b Studie bei 8 und 16 Wochen alten ZDF-Ratten. Die Abbildung zeigt die für die Messung der verschiedenen Parameter verwendeten Tiergruppen.

II.3.4 Behandlung von ZDF-Ratten mit Antidiabetika (Abb. II.3-c)

Je 8 obese ZDF-Ratten wurden, beginnend im Alter von sechs Wochen, mit Metformin in einer Dosierung von 400 mg / kg Körpergewicht (KGW) / Tag; mit Rosiglitazon in einer Dosierung von 3 mg / kg KGW / Tag oder mit einem PPAR- α -Agonisten, in einer Dosierung von 1 mg / kg KGW / Tag, behandelt.

Metformin wurde über das Trinkwasser, die beiden anderen Substanzen durch Einmischung ins Futter verabreicht.

Als Kontrollgruppe dienten 8 unbehandelte, obese ZDF-Ratten.

II.3.4.a Monitoring

Die Tiere wurden einmal wöchentlich gewogen. Weiterhin wurde der Futter- und der Wasserverbrauch pro Tier und 24 Stunden einmal pro Woche bestimmt.

In 2-wöchigem Abstand wurde den Tieren Blut aus der Schwanzspitze zur Bestimmung von Blutglukose und Glykohämoglobin (HbA1c) entnommen.

Im Abstand von 4 Wochen wurde den Tieren Blut zur Bestimmung der Serumkonzentrationen von Insulin, Triglyzeriden, Ketonkörpern sowie der FFS aus dem sternalen Venenplexus entnommen.

II.3.4.b Bestimmung des Körperfettanteils

Im Alter von 12 Wochen wurde bei den Tieren der Körperfettanteil mittels ^1H -NMR-Spektroskopie bestimmt.

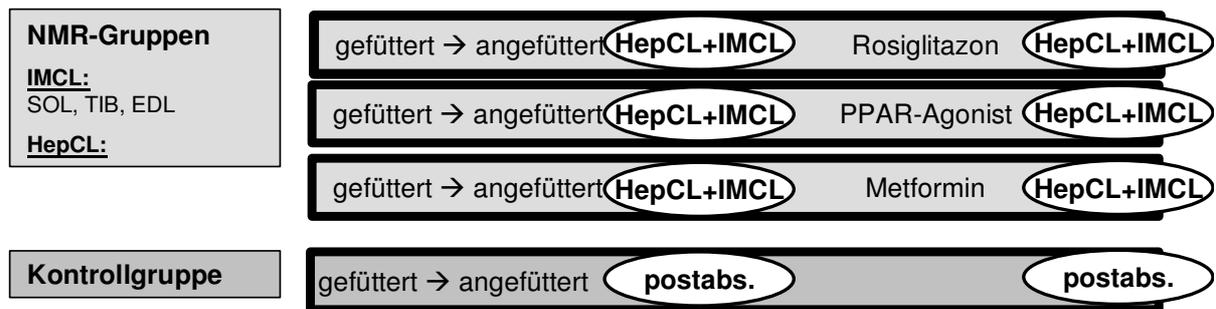
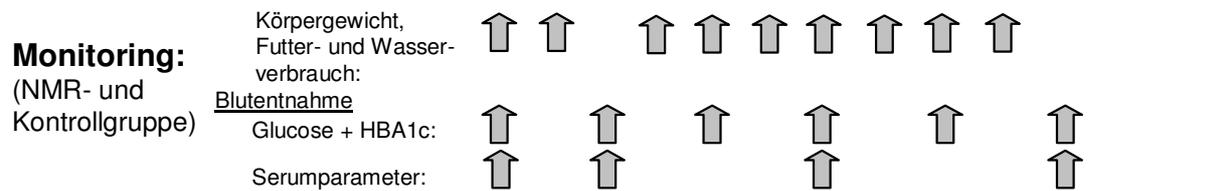
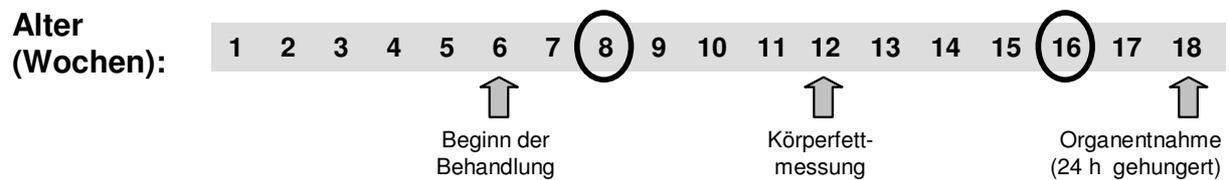
II.3.4.c Bestimmung von Malonyl-CoA und LCACoA

Im Alter von 18 Wochen wurden die Tiere nach einer 24-stündigen postabsorptiven Phase getötet.

Es wurden die Leber zur Bestimmung von Malonyl-CoA und der LCACoA sowie ein Aliquot des LONG zur Bestimmung der LCACoA entnommen.

Studiendesign: ZDF-Ratten (behandelt mit Antidiabetika)

Versuchstiere:	männliche obese ZDF Ratten (fa/fa Gmi)
5-Tage-Studiendesign:	gefüttert, 24 h postabsorptiv, 48 h postabsorptiv, 72 h postabsorptiv, angefüttert
NMR-Gruppen: (intraindividuelle Studie)	Rosiglitazon (3mg/kg/Tag oral im Futter): gefüttert, 24 h, 48h, 72h, angefüttert: n=8 PPAR-Agonist (1mg/kg/Tag im Futter): gefüttert, 24 h, 48h, 72h, angefüttert: n=8 Metformin (400mg/kg/Tag im Trinkwasser): gefüttert, 24 h, 48h, 72h, angefüttert: n=8
Kontrollgruppe: (intraindividuelle Studie)	Kontrolle (obese ZDF unbehandelt): n=8 gefüttert, 24 h, 48h, 72h, angefüttert: n=8,
Alter zum Zeitpunkt der Postabsorptionsstudie:	8 und 16 Wochen (O)



Blutparameter: (NMR- und Kontrollgruppe) Glukose, Insulin, Triglyzeride, FFS, Ketonkörper

Organparameter: (NMR- und Kontrollgruppe)
 Leber: Malonyl-CoA und LCACoA
 LONG: LCACoA

Abb. II.3-c Studie bei 8 und 16 Wochen alten behandelten, obesen ZDF-Ratten. Die Abbildung zeigt die für die Messung der verschiedenen Parameter verwendeten Tiergruppen (postabs.: postabsorptive Phase).

II.3.5 Postabsorptions-Studie bei ZDF-Ratten unter Behandlung mit Antidiabetika (Abb. II.3-c)

Diese Studie wurde mit den behandelten Tieren aus Studie II.3.4 im Alter von 8 sowie im Alter von 16 Wochen durchgeführt.

Die Verabreichung der jeweiligen Substanz erfolgte während der postabsorptiven Phase über eine Magen-Schlund-Sonde (Knopfkanüle, Acufirm, Dreieich, Deutschland) in einer Suspension mit 1%iger Tyloسلösung (Methylcellulose, Fluka AG, Buchs, Schweiz).

II.3.5.a Bestimmung des intrazellulären Lipidgehaltes mittels ¹H-NMR-Spektroskopie

IMCL in TIB, EDL und SOL sowie der HepCL-Gehalt wurden im Rahmen des fünftägigen Versuchsprotokolls täglich bestimmt.

Bei den Tieren wurde täglich eine Blutentnahme zur Bestimmung metabolischer Parameter im Serum durchgeführt.

Als unbehandelte Kontrollgruppen dienten die Tiere aus Studie II.3.2 und II.3.3.

II.4 Bestimmung der Stoffwechselfparameter im Blut

Die Analysen der Stoffwechselfparameter im Blut wurden von den Mitarbeitern des biochemischen Analyzelabors der Aventis Pharma Deutschland GmbH unter Leitung von Dr. Gabriele Biemer-Daub sowie von den Mitarbeitern des pharmakologischen Labors der Disease Group (DG) „Metabolic Diseases“ der Aventis Pharma Deutschland GmbH unter Leitung von Prof. Dr. Jürgen Sandow durchgeführt.

Die Blutentnahmen für die Analysen erfolgten entweder aus der Schwanzspitze (Glukose, HbA1c) oder durch Punktion des sternalen Venenplexus (Insulin, Triglyzeride, FFS, Ketonkörper).

Die Entnahme aus der Schwanzspitze erfolgte nach Stichinzision mit volumenbegrenzten Einmal-Mikropipetten (Firma Brand, Wertheim, Deutschland).

Die Punktion des sternalen Venenplexus wurde am narkotisierten Tier (2,5 Vol.-% Isofluran (Firma Baxter) in einem O₂ / N₂O-Gemisch im Verhältnis 1:2) durchgeführt. Zur Entnahme wurden Einmalkanülen (0,6 x 25; Firma Henke-Sass,

Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland) mit aufgesetzter 1 ml-Spritze (Firma Codan Medical ApS, Rodby, Dänemark) verwendet. Es wurden jeweils 0,5 - 0,7 ml Blut entnommen, in Serum-Gel-Probengefäße (1,3 ml; Firma Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) überführt und abzentrifugiert (5 min bei 4°C und 2800 x g (Heraeus Biofuge fresco, Firma Kendro)).

II.4.1 Parameter des Glukosestoffwechsels

Für die Glukosebestimmung wurden 10 µl Vollblut mit einer Digitoninlösung 1:50 verdünnt. Die Digitoninlösung bestand aus 100 mg Digitonin und 100 mg Maleinimid (beide Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1000 ml Aqua bidest. Die Analyse erfolgte mit dem Test-Kit „Gluko-Quant®“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) in einem „Epos 5060“-Analyzer (Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Dieser enzymatische Test basiert auf der HK-Reaktion. Das entstehende NADPH (Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat) wird photometrisch bestimmt.

Der HbA1c ist der Anteil von glykosyliertem Hämoglobin am Gesamthämoglobin. Er korreliert positiv mit dem mittleren Blutglukosespiegel der letzten 6 – 8 Wochen (beim Menschen) und stellt den wichtigsten Parameter der Diabetes-Therapiekontrolle dar (STETTLER et al, 2000). Die Analyse wurde aus einer 1:100-Verdünnung mit „Hemolyzing Reagent“ zur HbA1c-Bestimmung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Sie erfolgte mit einem „Roche / Hitachi 912“ –Analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Als Test-Kit wurde „Tina-quant®“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet. Der Test basiert auf einer Antigen-Antikörperreaktion. Photometrisch detektiert wird dabei ein unlöslicher Komplex aus überschüssigen Antikörpern und zugesetztem Polyhaptan über Turbidimetrie (Trübungsmessung). Die Gesamt-Hämoglobinkonzentration wird bichromatisch bestimmt.

Die Insulinbestimmung erfolgte mit einem Radioimmunoassay (RIA) mit „Sensitive Rat Insulin Ria Kit“ (Firma Linco Research Inc., St. Charles, USA).

II.4.2 Parameter des Lipidstoffwechsels

Die Analysen von Triglyzeriden, FFS und Ketonkörpern wurden mit einem „Roche / Hitachi 912“ –Analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Die Bestimmung der Triglyzeride erfolgte mit dem „TG GPO-PAP“ Test-Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Es handelt sich dabei um einen enzymatischen in-vitro-Test.

Die FFS wurden mit dem „NEFA C“ (Wako Chemicals, Neuss, Deutschland), einem enzymatischen Farbttest, analysiert.

Für die Analyse der Ketonkörper wurde der „Autokit Total Ketone Bodies“ (Wako Chemicals, Neuss, Deutschland) verwendet. Es handelt sich dabei um einen in-vitro-Assay zur photometrischen Bestimmung der Gesamt-Ketonkörper als Summe aus Acetoacetat und Hydroxybutyrat (HO-Butyrat). Zur Messung von HO-Butyrat wurde der „Autokit 3-HB“ (Wako Chemicals, Neuss, Deutschland) verwendet. Bei diesem Test handelt es sich ebenfalls um einen photometrischen in-vitro-Assay. Die Konzentration von Acetoacetat ergibt sich aus der Differenz von Gesamt-Ketonkörpern und HO-Butyrat.

II.5 Bestimmung der Stoffwechsellparameter in Skelettmuskulatur und Leber

II.5.1 ¹H-NMR-Spektroskopie

Die ¹H-NMR-Spektroskopie (Protonenmagnetresonanzspektroskopie) ermöglicht es, Stoffwechsellvorgänge in vivo zu beobachten.

Mit Hilfe volumenselektiver Sequenzen ist es möglich, Metabolitenkonzentrationen isoliert in dem für den Untersucher interessanten Bereich eines Organs zu ermitteln.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe dieser Technik die Konzentration intrazellulärer, nicht-adipozytärer Lipide bestimmt.

Für die Messungen wurden die Tiere mit 2 Vol.-% Isofluran in einem Gemisch aus O₂ / N₂O im Verhältnis 1:2 narkotisiert. Die Narkose wurde in einem halboffenen System („Titus“, Firma Dräger, Lübeck, Deutschland) mit einer Narkosemaske durchgeführt. Die Narkoseüberwachung erfolgte durch Kontrolle der Atemfrequenz mit einem Atemmonitor (Physioguard, Firma Bruker Biospin GmbH, Ettlingen,

Deutschland). Die im Studiendesign vorgesehene Blutentnahme wurde vor der jeweiligen Messung durchgeführt. Während den Messungen wurde ein Absinken der Körpertemperatur durch eine Wärmematte verhindert.

II.5.1.a Messung intramyozellulärer Lipide

Die IMCL-Messung erfolgte mit einem 7 Tesla (T) Magneten der Firma Bruker Biospin GmbH (Ettlingen, Deutschland) über in-vivo- ^1H -NMR-Spektroskopie (KUHLMANN et al, 2003). Die Anregung erfolgte durch einen von einem Resonator ausgesendeten Hochfrequenzpuls. Das Signal wurde mit Hilfe einer Oberflächenspule detektiert.

Die Messungen erfolgten an der rechten Hintergliedmaße. Das Bein wurde so positioniert, dass der Faserverlauf der Unterschenkelmuskulatur parallel zur Richtung des Magnetfeldes B_0 verlief. Der Unterschenkel kam dabei im Zentrum des Magneten und der Oberflächenspule zu liegen. Die Positionierung des Beines entsprechend dem Verlauf der Muskelfasern ist essentiell, um eine möglichst große Frequenzverschiebung zwischen adipozytärem, extramyozellulärem Lipid (EMCL) und IMCL zu erreichen: Diese Frequenzverschiebung entsteht aufgrund der unterschiedlichen geometrischen Anordnung beider Lipidkompartimente: Während das adipozytäre EMCL parallel zur Muskelfaser liegt, findet man das IMCL in Form kleiner Lipid-Droplets vor. Damit ist die EMCL-Signalfrequenz abhängig von der Ausrichtung im Magnetfeld. Die IMCL-Frequenz ist dagegen aufgrund der sphärischen Struktur der Droplets richtungsunabhängig. Eine optimale Trennung beider Lipidkompartimente ist erreicht, wenn der Faserverlauf der Muskulatur parallel zum Magnetfeld verläuft.

Für die Positionsbilder wurde eine Spin-Echo-Sequenz gewählt. Die Detektion des Signals erfolgte nach einer Echozeit (TE) von 13 ms. Die Repetitionszeit (TR) betrug 500 ms. Es wurden je 1 Aufnahme in der Koronar- (xz-) und der Sagittalebene (yz-Ebene) sowie 4 Aufnahmen in der Transversalebene (xy-Ebene) erstellt. Der Abstand zwischen den Aufnahmen in der Transversalebene betrug 3 mm, die Schichtdicke der Aufnahmen 1,5 mm. Die Auflösung der Aufnahmen betrug $200\ \mu\text{m}$ / Pixel bei einem Field of View (FOV, Gesichtsfeld) von $5 \times 5\ \text{cm}$. (Abb. II.5.1.a).

Nach Aufnahme des Positionsbildes wurden nun nacheinander Spektren des TIB, EDL sowie des SOL erstellt. Der TIB stellt dabei den „fast-twitch glykolytischen“ Muskeltyp dar, während der SOL den oxidativen „slow-twitch“ Muskel repräsentiert

(ARMSTRONG et al, 1984). Die oxidative Kapazität des EDL liegt zwischen den beiden anderen Muskeltypen (ARMSTRONG et al, 1984).

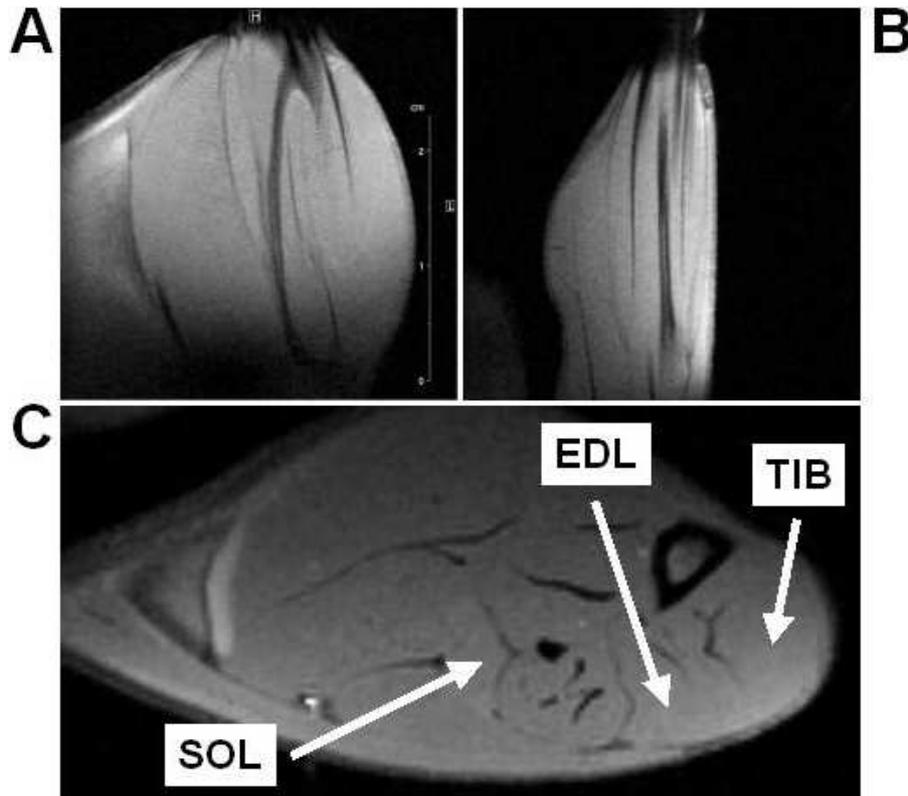


Abb. II.5.1.a Positionierung des Voxels für die NMR-Spektroskopie.

- A:** Positionsbild in der Koronarebene (dient der Auswahl des Querschnitts auf optimaler Höhe des Unterschenkels)
 - B:** Positionsbild in der Sagittalebene
 - C:** Positionsbild in der Transversalebene (dient der Positionierung des Voxels im Muskel)
- SOL:** M. Soleus; **EDL:** M. Extensor Digitorum Longus; **TIB:** M. Tibialis Anterior

Das Voxel wurde im Zentrum eines jeden Muskels positioniert, um störende Signale des umgebenden adipozytären Fettes zu vermeiden. Das verwendete Voxel hatte eine Kantenlänge von 1,6 x 1,6 x 3,2 mm. Zur Messung wurde eine sogenannte PRESS-Sequenz (Point-Resolved Volume Selective Spectroscopy) (BOTTOMLEY, 1987) verwendet. Wasser stellt den Hauptbestandteil von Muskelgewebe dar. Dieser Peak würde das deutlich kleinere Kreatinsignal, welches als Referenz verwendet wurde, überdecken. Daher wurden, zur Unterdrückung des Wassers, der PRESS-Sequenz 3 CHESS-Pulse (Chemical-Shift Selective) vorgeschaltet. Die TE-Zeit betrug 17 ms, die TR-Zeit 1 s. Insgesamt wurden pro Spektrum 512 FID's (Free Induction Decay, freier Induktionsabfall) aufaddiert. Die Spektralweite für die Detektion betrug 5000 Hz.

II.5.1.b Messung hepatozellulärer Lipide

Die HepCL-Messung erfolgte nach KUHLMANN et al (2003) über volumenselektive ^1H -Spektroskopie an der narkotisierten Ratte. Da die Leber sich infolge der Atmung in ständiger Bewegung befindet, wurde, um Bewegungsartefakte zu vermeiden, eine Triggerung auf die Atemfrequenz vorgenommen. Dies erfolgte mit dem Physioguard Atemmonitor der Firma Bruker Biospin GmbH.

Die Versuchstiere wurden für die Messungen in Bauchlage so fixiert, dass die Leber auf der Empfangsspule zu liegen kam.

Das Positionsbild wurde entsprechend dem der Muskulatur erstellt. Die Kantenlänge für das Voxel betrug $2,5 \times 2,5 \times 2,5$ mm.

Das Spektrum wurde mit der PRESS-Sequenz mit folgenden Messparametern aufgenommen: Die TE-Zeit betrug 25 ms, die TR-Zeit wurde auf mindestens 1 s festgelegt. Da bei diesen Messungen Wasser als Referenzsignal herangezogen wurde, erfolgten die Messungen ohne Wasserunterdrückung. 128 FID's wurden aufaddiert. Die Spektralweite betrug 5000 Hz.

II.5.1.c Bestimmung des Körperfettanteils

Der Körperfettanteil wurde durch nicht-volumenselektive ^1H -NMR-Spektroskopie (nach MYSTKOWSKI et al 2000) mit einem 4,7 T Magneten der Firma Bruker Biospin GmbH (Ettlingen, Deutschland) ermittelt.

Die narkotisierten Tiere wurden in Seitenlage so fixiert, dass der Körper auf einer möglichst kleinen Fläche zu liegen kam.

Die Spektren (Abb. II.5.1.c) wurden mit der ONEPULSE-Sequenz (Firma Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Deutschland) durch Aufnahme des globalen FID-Signals erstellt. Dabei wurde eine TR-Zeit von 3 s gewählt. Je Spektrum wurden 16 FID's aufaddiert. Die Spektralweite betrug 6000 Hz.

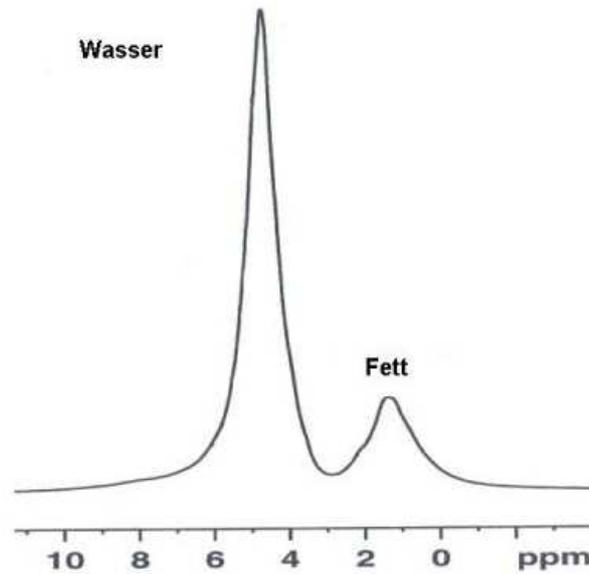


Abb. II.5.1.c Spektrum für die Bestimmung des Körperfettanteils.

II.5.2 Biochemische Parameter

II.5.2.1 Organentnahme

Die Tiere wurden für die Organentnahme zur Bestimmung der biochemischen Stoffwechselfparameter mit 4 % Isofluran (Baxter[®]) in einem Gemisch aus O₂ / N₂O im Verhältnis 1:2 in einem halboffenen Narkosesystem („Titus“, Firma Dräger, Lübeck, Deutschland) mit Narkosemaske anästhesiert. Nach Eröffnen der Bauchhöhle mit einer chirurgischen Schere wurden die Tiere durch Blutentzug aus der Aorta getötet.

Sodann wurden, unter Zuhilfenahme einer anatomischen Pinzette und einer chirurgischen Schere, 2 ca. 1 g schwere Stücke der Leber entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach erfolgte von lateral die Präparation des LONG. Im Lendenwirbelbereich wurde der Muskel von umgebendem Fett befreit und ein ca. 1 g schweres Aliquot entnommen. Der Unterschenkel des rechten Beines wurde mit einem Skalpell enthäutet. Sodann wurde der SOL unter Zuhilfenahme einer gebogenen anatomischen Mikropinzette von lateral aus der Tiefe herauspräpariert und abgesetzt. Der TIB, sowie der nach seiner Entfernung freiliegende EDL, wurde entnommen. Anschließend wurden die entsprechenden

Muskeln der linken Hintergliedmasse herauspräpariert (Operationsbesteck der Firma Aesculap, Tuttlingen, Deutschland).

Die entnommenen Organe wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff (-196 °C) schockgefroren und bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

Die Lebern der Wistar-Ratten aus der Gruppe „SAT II“ wurden in toto entnommen und gewogen. 3 ca. 1 g schwere Stücke wurden zur Bestimmung des Wasseranteils, des Glykogen- und des Triglyzeridgehaltes in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

II.5.2.2 HPLC-Analytik

Mit der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) wurden tCr und Malonyl-CoA bestimmt sowie die Analyse der LCACoA durchgeführt.

Das chromatographische Verfahren stellt eine Sonderform der Säulenchromatographie dar. Im Gegensatz zur klassischen Säulenchromatographie wird bei der HPLC die mobile Phase unter hohem Druck durch die Säule, welche die stationäre Phase enthält, gepumpt. Dies ermöglicht eine, gegenüber der herkömmlichen Säulenchromatographie, deutlich verminderte Analysenzeit.

Bei der HPLC lassen sich verschiedene Trennmechanismen unterscheiden. Die hier angewendete „Reversed Phase“ (RP, Umkehrphase) Chromatographie basiert auf der unterschiedlichen Löslichkeit der Probenbestandteile in mobiler und stationärer Phase. Bei der Umkehrphasenchromatographie ist, im Gegensatz zur Normalphasenchromatographie, die mobile Phase polarer als die stationäre Phase. Die Trennung der Proben erfolgt somit aufgrund ihrer Polarität, wobei polare Probenbestandteile zuerst eluiert werden.

Eine HPLC-Anlage ist aus folgenden Teilen aufgebaut: Einem Vorratsbehälter für die mobile Phase, einem Gerät zur Entgasung der mobilen Phase (Degasser), einem Autosampler zur Aufbewahrung der Proben, einer Einspritzeinheit, einer Säule, einem Detektor sowie einem Computer zur Umrechnung der detektierten Signale.

Die Analysen wurden mit einer „Waters Alliance 2690“ HPLC-Anlage (Firma Waters, Eschborn, Deutschland) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit dem UV-Detektor „Waters 2487“ (Firma Waters, Eschborn, Deutschland). Zur Auswertung

wurde das Softwareprogramm „Waters Millennium³², Version 3.20, Software Chromatographic Manager“ (Firma Waters, Eschborn, Deutschland) verwendet.

Alle für die Analysen und die Aufarbeitung verwendeten Chemikalien wurden, soweit im Text nicht anders angeführt, von der Firma Riedel de Haen, Seelze, Deutschland bezogen. Die Pipetten stammten von der Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland.

II.5.2.2.a Bestimmung von tCr

Die Analyse von tCr wurde von den Mitarbeitern des biochemischen Analysenlabors der Abteilung Lead Optimization (LO) „Biomarker“ unter Leitung von Dr. Martin Gerl / DI Manfred Quint der Aventis Pharma Deutschland GmbH durchgeführt.

Der tCr-Gehalt wurde im TIB, im EDL und im SOL bestimmt.

Die gefriergetrockneten Muskeln wurden homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit MilliQ-Wasser (Wasserreinigungssystem der Firma Millipore, Billerica, USA) verdünnt und auf die HPLC-Säule aufgetragen. Die Trennung erfolgte durch eine Kationenchromatographie in Anlehnung an eine Methode von YOKOYAMA et al (2000).

II.5.2.2.b Bestimmung von Malonyl-CoA

Die Analyse von Malonyl-CoA wurde von den Mitarbeitern des biochemischen Analysenlabors der Abteilung Lead Optimization (LO) „Biomarker“ unter Leitung von Dr. Martin Gerl / DI Manfred Quint der Aventis Pharma Deutschland GmbH durchgeführt.

Die Analyse des Malonyl-CoA-Gehaltes erfolgte in der Leber sowie in TIB, SOL und EDL.

Ein Aliquot des gefrorenen Gewebes wurde in Perchlorsäure homogenisiert und danach zentrifugiert (modifizierte Methode von ODLAND et al, 1996). Der Überstand wurde durch eine Festphasenextraktion gereinigt und aufkonzentriert.

Die HPLC-Analyse wurde mit einem modifizierten Verfahren von SADDICK et al (1993) durchgeführt.

II.5.2.2.c Bestimmung der LCACoA

Die LCACoA wurden im LONG, einem glykolytischen Muskel, und in der Leber bestimmt. Im Muskelgewebe wurde dabei Palmitoyl-CoA (C16:0), Palmitoleoyl-CoA (C16:1), Oleoyl-CoA (C18:1) sowie die Summe aus Linoleoyl-CoA (C18:2) und Arachidonoyl-CoA (C20:4) analysiert. In der Leber wurden Palmitoyl-CoA (C16:0), Palmitoleoyl-CoA (C16:1), Stearoyl-CoA (C18:0), Oleoyl-CoA (C18:1), Linoleoyl-CoA (C18:2) sowie Arachidonoyl-CoA (C20:4) bestimmt.

Für diese Analysen wurde das von DEUTSCH et al (1994) veröffentlichte Verfahren zur Bestimmung der LCACoA's im Gehirn auf die Untersuchung von Skelettmuskel- und Lebergewebe adaptiert.

Das gefriergetrocknete Gewebe wurde in saurem Medium homogenisiert und nach Neutralisation extrahiert. Nach Abzentrifugieren der Festbestandteile und Verdünnung der Probe erfolgte eine Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) zur Aufkonzentrierung und Reinigung. Danach wurde die Probe auf die HPLC-Säule aufgetragen. Zur Quantifizierung wurde eine Eichkurve für jede der zu messenden aktivierten Fettsäuren erstellt. Um schwankende Extraktionsraten zu korrigieren, wurde vor der Homogenisation Heptadecanoyl-CoA (C17:0) als interner Standard (DEUTSCH et al, 1994; MANGINO et al, 1992; ROSENDAL et al, 1992) zugefügt.

Probenaufarbeitung

Das Gewebe wurde für 16 Stunden in einer Gefriertrocknungsanlage (Firma Christ, Osterode, Deutschland, Vakuumpumpe Firma Vacuubrand, Wertheim, Deutschland) lyophilisiert. Zu einem Aliquot von 100 mg (\pm 5 mg) im Falle des LONG bzw. 50 mg (\pm 5 mg) im Falle der Leber wurden 2 ml einer 100 mM Kaliumdihydrogenphosphatlösung (KH_2PO_4) (pH 2) gegeben. Der Probe wurde weiterhin 20 μl einer 100 μM wässrigen Lösung des internen Standards zugefügt. Anschließend folgte die Homogenisation der Probe mit einem Ultra-Turrax. Danach wurde die Probe mit 200 μl einer 4,5 %-igen Kaliumhydroxidlösung (KOH) versetzt. Es wurden sodann 2 ml 2-Propanol, 0,25 ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) sowie 4 ml ACN zugefügt.

Es folgte eine 15 min andauernde Extraktionsphase in einem Drehschüttler (Firma Heidolph, Kelkheim, Deutschland). Nach dieser Zeit wurden die Festbestandteile bei 2800 x g für 5 min abzentrifugiert (Kendro Laborprodukte

GmbH; Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde mit einer 100 mM KH_2PO_4 -Lösung (pH 4,9) 1:2 verdünnt.

Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion erfolgte mit Bond Elut PPL-Säulen (100 mg, 3 ml; Varian, Darmstadt, Deutschland). Die Säulen wurden mit 5 ml ACN und 2 ml einer 25 mM KH_2PO_4 -Lösung (pH 4,9) konditioniert. Nach der Konditionierung erfolgte das Auftragen der Proben. Die Säulen wurden mit 4 ml einer 25 mM KH_2PO_4 -Lösung (pH 4,9) gewaschen und die Proben mit 1 ml einer, aus 40% 100 mM KH_2PO_4 und 60 % ACN bestehenden, Lösung eluiert. Mit Ausnahme von der Probenelution wurden die jeweiligen Flüssigkeiten in einer Vakuumkammer (Chromabond[®] für 12 Säulen, Machery-Nagel, Düren, Deutschland) mit einem Unterdruck von -15 kPa (Vakuumpumpe Firma Greiffenberger Antriebstechnik Marktredwitz, Deutschland) durch die Säulen gesaugt.

HPLC-Analyse

Ein Aliquot von 30 μl des erhaltenen Eluats wurden auf die HPLC-Säule aufgetragen.

Es wurde eine Synergi hydro Säule (150 x 0,3 mm; 4 μm) (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) verwendet. Die Messung wurde unter isothermen Bedingungen bei 40°C Säulentemperatur durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die mobile Phase setzte sich im Falle der Muskelproben aus einer 25 mM KH_2PO_4 -Lösung, pH 4,9 (Lösung A) sowie 100% ACN (Lösung B) zusammen. Für die Analyse der Leberproben wurde mit 100%igem Methanol (Lösung C) eine dritte mobile Phase eingesetzt.

Das Gradientensystem setzte sich wie folgt zusammen: Bei der Analyse der Skelettmuskelproben wurde mit einem Verhältnis 70:30 von Lösung A zu Lösung B gestartet. In einem Zeitraum von 30 min wurde dieses Verhältnis auf 30% Lösung A und 70% Lösung B umgedreht. Die Flussrate betrug dabei 0,4 ml / min. Nach Ablauf dieser 30 min wurde die Flussrate auf 0,5 ml / min heraufgesetzt und der Gradient innerhalb einer Minute wieder auf die Ausgangsbedingungen gebracht. Es folgte eine 13 min andauernde isokratische Phase bei den beschriebenen Bedingungen (Abb. II.5.2.2-c). Vor Auftragen der nächsten Probe wurde die Flussrate wieder auf die anfänglichen 0,4 ml / min reduziert. Bei der oben beschriebenen Methode kam es zur

Koelution von Linoleoyl-CoA (C18:2) und Arachidonoyl-CoA (C20:4) (DEUTSCH et al, 1994). Stearoyl-CoA (C18:0) konnte nicht quantifiziert werden. Aus diesem Grund wurde der Gradient für die Analyse der Leberproben modifiziert.

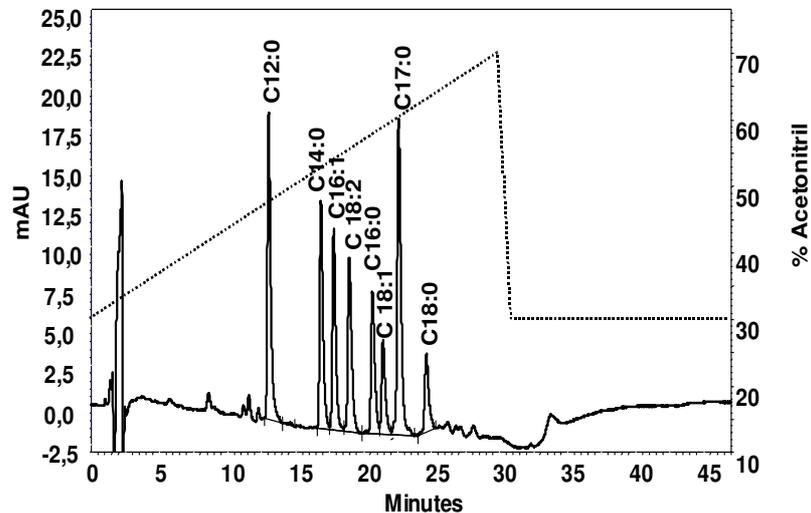


Abb. II.5.2.2-c Analyse der LCACoA im Skelettmuskel.

Linke y-Achse: Peakhöhe (mAU; arbitrary unit)

Rechte y-Achse: ACN-Anteil an der mobilen Phase

(Die mittellangkettigen CoA's C12:0 und C14:0 wurden nicht in die Auswertung einbezogen; C18:0 war nicht reproduzierbar zu quantifizieren)

Für die Analyse der Leberproben wurde Lösung C über den gesamten Analysenzeitraum hinweg konstant bei 30 % gehalten. Lösung A wurde innerhalb von 30 min von zunächst 40 % auf 20 % reduziert. Dagegen wurde der Anteil von Lösung B in diesem Zeitraum von 30 % auf dann 50 % erhöht. Die Analyse der Leberproben erfolgte bei konstanter Flussrate von 0,5 ml / min. Die Rückkehr zu den Ausgangsbedingungen erfolgte für die Leberproben analog zur Analyse in der Skelettmuskulatur.

Retentionszeiten

Es wurden folgende Retentionszeiten ermittelt (Tab. II.5.2.2.c-1):

LONG		Leber	
LCACoA	Retentionszeit (min)	LCACoA	Retentionszeit (min)
C16:1	18,0	C16:1	12,4
C18:2 + C20:4	19,4	C20:4	14,0
		C18:2	14,6
C16:0	21,0	C16:0	17,8
C18:1	21,9	C18:1	19,1
C17:0	23,2	C17:0	21,4
		C18:0	25,1

Tab. II.5.2.2.c-1 Retentionszeiten bei der Analyse der LCACoA im M. Longissimus Dorsi (LONG) und in der Leber.

Kalibrierung

Die Eichkurven wurden aus einer wässrigen Stammlösung, welche die einzelnen CoA's in einer Konzentration von 100 µmol / l enthielt, erstellt. Die CoA's wurden für die Kalibrierung als Lithiumsalz zugesetzt (Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Es wurden 1 µl, 2 µl, 5 µl, 10 µl sowie 20 µl der Stammlösung zu den vorgelegten 2 ml KH₂PO₄ hinzugefügt. Vor der HPLC-Analyse wurden alle bei der Organaufarbeitung beschriebenen Schritte der Extraktion und Reinigung durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte als Doppelbestimmung.

Linearität

Die Linearität wurde in Pufferlösung sowie im zu untersuchenden Gewebe unter Aufstockung mit den Standardlösungen bestimmt (Tab. II.5.2.2.c-2). Zur Bestimmung der Linearität in Pufferlösung wurden die Eichkurven herangezogen. Den Muskelproben wurden vor der Aufarbeitung 0 µl, 1 µl, 2µl, 5 µl, 10µl und 20µl einer 100 µM Lösung aller zu messenden CoA's zugesetzt. Die Leberproben wurden mit 0 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl und 40 µl einer Stammlösung mit folgenden Konzentrationen versetzt: C18:2: 400 µM; C18:0: 40 µM; alle übrigen CoA's: 100 µM. Die Linearitätsbestimmung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Steigungen der Geraden aus den Aufstockungen im Gewebe unterschieden sich nur geringfügig von denen in Pufferlösung.

LONG			Leber		
LCACoA	r ² Muskelaufstockung	r ² Pufferlösung	LCACoA	r ² Leberaufstockung	r ² Pufferlösung
C16:0	0,9974	0,9995	C16:0	0,9990	0,9974
C16:1	0,9994	0,9997	C16:1	0,9974	0,9971
			C18:0	0,9964	0,9987
C18:1	0,9972	0,9996	C18:1	0,9983	0,9972
C18:2 + C20:4	0,9978	0,9996	C18:2	0,9982	0,9911
			C20:4	0,9930	0,9972

Tab. II.5.2.2.c-2 Linearität bei der Analyse der LCACoA im M. Longissimus Dorsi (LONG) und in der Leber (r²: Regressionskoeffizient).

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit (Tab. II.5.2.2.c-3) der Methode wurde mit einem Pool aus 600 mg gefriergetrocknetem Gewebe überprüft. Das Gewebe wurde in 6 Proben zu je 100 mg aufgeteilt und getrennt aufgearbeitet. Aus Mittelwert und Standardabweichung der Ergebnisse aus den 6 Analysen wurde die relative Standardabweichung berechnet (% RSD).

LONG		Leber	
LCACoA	% RSD	LCACoA	% RSD
C16:0	4,67	C16:0	8,02
C16:1	8,39	C16:1	9,69
		C18:0	6,94
C18:1	14,11	C18:1	8,71
C18:2 + C20:4	6,56	C18:2	11,36
		C20:4	8,57

Tab. II.5.2.2.c-3 Reproduzierbarkeit bei der Analyse der LCACoA im M. Longissimus Dorsi (LONG) und in der Leber.

Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate wurde mittels Aufstockung im Muskel und in der Leber mit den Lithiumsalzen der LCACoA's ermittelt (Tab. II.5.2.2.c-4). Die Standards wurden vor der Homogenisation des Gewebes zugegeben. Die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

Muskelaufstockung (LONG) (nach Subtraktion des Leerwertes)				Leberaufstockung (nach Subtraktion des Leerwertes)			
LCACoA	eingesetzt (nmol/ml)	gefunden (nmol/ml)	Wieder- findungs- rate (%)	LCACoA	eingesetzt (nmol/ml)	gefunden (nmol/ml)	Wieder- findungs- rate (%)
C16:0	0,10	0,09	86	C16:0	0,5	0,50	101
	0,50	0,68	135		1	0,95	95
	1,00	1,45	145		2	1,79	90
	2,00	2,63	131		4	3,59	90
C16:1	0,10	0,06	55	C16:1	0,5	0,49	98
	0,50	0,47	94		1	1,04	104
	1,00	1,10	110		2	1,84	92
	2,00	1,79	89		4	3,95	99
				C18:0	0,2	0,26	128
					0,4	0,40	99
					0,8	0,77	96
					1,6	1,58	99
C18:1	0,10	0,05	46	C18:1	0,5	0,5	100
	0,50	0,53	107		1	0,98	98
	1,00	1,14	114		2	1,77	88
	2,00	2,07	103		4	3,70	92
C18:2 + C20:4	0,10	0,10	103	C18:2	2	1,84	92
	0,50	0,63	126		4	3,65	91
	1,00	1,39	139		8	6,56	82
	2,00	2,24	112		16	13,68	85
				C20:4	0,5	0,39	77
					1	0,84	84
					2	1,46	73
					4	3,33	83

Tab. II.5.2.2.c-4 Wiederfindungsrate bei der Analyse der LCACoA im M. Longissimus Dorsi (LONG) und in der Leber.

II.5.2.3 Bestimmung des Wasseranteils in der Leber

Der Wasseranteil in der Leber wurde durch Gewichtsbestimmung eines Aliquots vor und nach einer 24-stündigen Gefriertrocknung ermittelt.

II.5.2.4 Bestimmung des Glykogengehaltes in der Leber

Die Bestimmung des Glykogengehaltes in der Leber wurde von den Mitarbeitern des biochemischen Analyselabors der Aventis Pharma Deutschland GmbH unter Leitung von Dr. Gabriele Biemer-Daub durchgeführt.

Die Glykogenbestimmung erfolgte nach der Methode von KEPPLER et al (1974). Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Umsetzung von Glykogen zu Glukose durch die Amyloglucosidase. Das dabei entstehende NADPH wird photometrisch gemessen.

II.5.2.5 Bestimmung des Triglyzeridgehaltes in der Leber

Die Bestimmung des Triglyzeridgehaltes in der Leber wurde von den Mitarbeitern des pharmakologischen Labors der Aventis Pharma Deutschland GmbH unter Leitung von Dr. Hans-Ludwig Schäfer durchgeführt.

Die Triglyzeride wurden mit einem Gemisch aus Methanol und Dichlormethan aus der Leber extrahiert und, nach Abdampfen des Lösungsmittels, in 2-Propanol aufgenommen. Die Messung erfolgte an einem Cobas Mira Plus (Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) Analysengerät mit einem enzymatischen Farbttest (Testkit „TG GPO PAP“ der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

II.6 Auswertungen

II.6.1 Bestimmung der Stoffwechselfparameter in Skelettmuskulatur und Leber

II.6.1.a ¹H-NMR-Spektroskopie

Nach einer Phasenkorrektur des aus dem FID errechneten Frequenzspektrums wurden die Spektren auf das jeweilige Referenzsignal kalibriert.

Die Kalibrierung erfolgte bei der Bestimmung des IMCL auf den Kreatinpeak bei 3,05 ppm (parts per million). Für die Spektren zur Erfassung des HepCL sowie des Körperfettanteils wurde das Wassersignal bei 4,7 ppm als Referenz herangezogen.

Zur Quantifizierung der Muskelspektren wurde der Quotient aus den Integralen von Methylen- und Kreatinsignal des IMCL gebildet (IMCL / tCr; Abb. II.6.1.a).

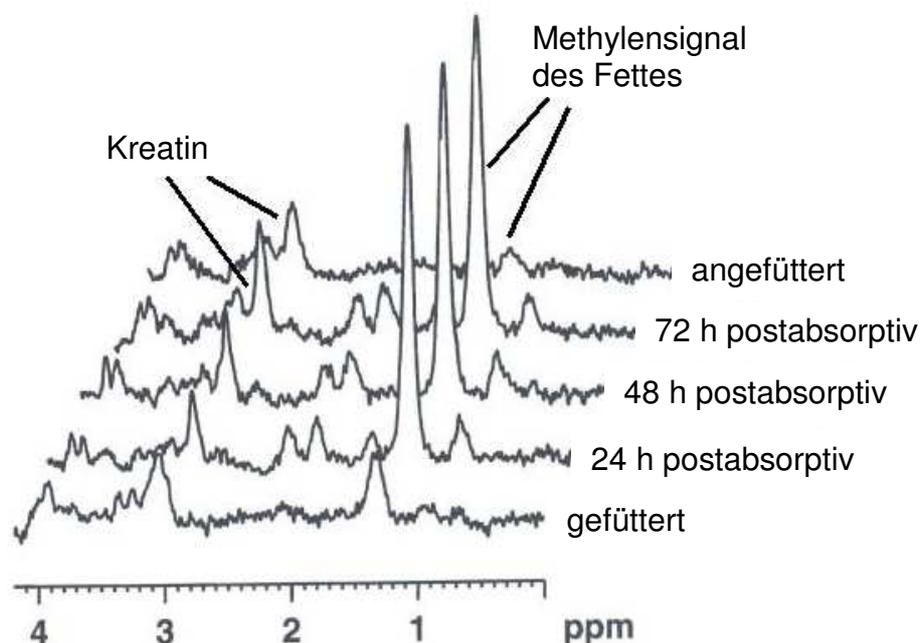


Abb. II.6.1.a IMCL-Spektren des M. Tibialis Anterior im Verlauf des 5-tägigen Versuchsprotokolls.

Die Leberspektren wurden durch das Verhältnis der Flächen des Wasser- sowie des Methylensignals des Fettes quantifiziert. Die Ergebnisse wurden in Prozent des Wassersignals angegeben.

Für die Bestimmung des Körperfettanteiles wurde das Integral über dem Signal des Fettes und über dem Signal des Wassers gebildet und dieses zum Signal des Fettes ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse stellen somit den Anteil an Fett an der Summe aus Fett und Wasser dar. Zusätzlich wurde das Ergebnis mit einem Korrekturfaktor von 0,71 multipliziert, um die bei gleicher Masse unterschiedlichen Peakflächen des Wasser- sowie des Methylsignals vom Fett auszugleichen.

II.6.1.b Biochemische Parameter

tCr

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte nach der Peakfläche. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe der erstellten Eichkurve vorgenommen. Das Ergebnis der Bestimmung von tCr stellt die Summe aus Kreatin und Kreatinphosphat dar.

Malonyl-CoA

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte nach der Peakhöhe. Die Quantifizierung erfolgte anhand der erstellten Eichkurve unter Berücksichtigung der Peakhöhe des Internen Standards.

LCACoA

Die Auswertung erfolgte nach der Peakhöhe. Diese wurde zur Höhe des I.S. ins Verhältnis gesetzt. Danach erfolgte die Quantifizierung anhand der Eichkurve.

II.6.2 Statistik

II.6.2.a Varianzanalysen

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Software-Programms „Sigma Stat 2.03“ (Jandel Scientific GmbH, Erkrath, Deutschland). Es wurden jeweils der arithmetische Mittelwert sowie der Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) angegeben. Als minimales Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen.

Intraindividuelle Studien

Die intraindividuellen Studien wurden mittels einer einfaktoriellen, Bonferroni-korrigierten Varianzanalyse für wiederholte Messungen ausgewertet. Als Referenz wurde jeweils der Wert der gefütterten Tiere herangezogen.

Interindividuelle Studien

Die interindividuellen Studien wurden mittels einfaktorieller, Bonferroni-korrigierter Varianzanalyse ausgewertet. Auch hier diente als Referenz jeweils der Wert der gefütterten Tiere.

Gruppenvergleiche innerhalb eine Studie

Die Gruppen innerhalb einer Studie wurden mit Hilfe einer zweifaktoriellen, Bonferroni-korrigierten Varianzanalyse durchgeführt. Hierbei wurden die Gruppen an den verschiedenen Versuchstagen miteinander verglichen.

Studienvergleich

Die Vergleiche zwischen NMR- und Satellitengruppen wurden mit Hilfe einer zweifaktoriellen, Bonferroni-korrigierten Varianzanalyse durchgeführt. Die Gruppen wurden an den verschiedenen Versuchstagen miteinander verglichen.

II.6.2.b Regressionsanalysen

Die im Rahmen der Linearitätsbestimmung für die LCACoA-Messungen durchgeführten Regressionsanalysen erfolgten mit dem Programm Excel (Office 2000, Microsoft, Redmond, USA).

III Ergebnisse

III.1 Postabsorptionsstudie bei 16 Wochen alten Wistar-Ratten

III.1.1 Physiologische Parameter

Die untersuchten Tiere zeigten während der postabsorptiven Phase eine deutliche Abnahme des Körpergewichts, wobei diese Abnahme am ersten Tag der postabsorptiven Periode mit im Mittel 30 g am deutlichsten ausfiel. Mit Wiederanfütterung der Tiere am fünften Versuchstag stieg das Körpergewicht wieder an. Das Körpergewicht der Satellitengruppe lag über den gesamten Versuchszeitraum hinweg signifikant niedriger als das der NMR-Gruppen, zeigte aber während des fünftägigen Versuchsprotokolls denselben Verlauf (Abb. III.1.1-1).

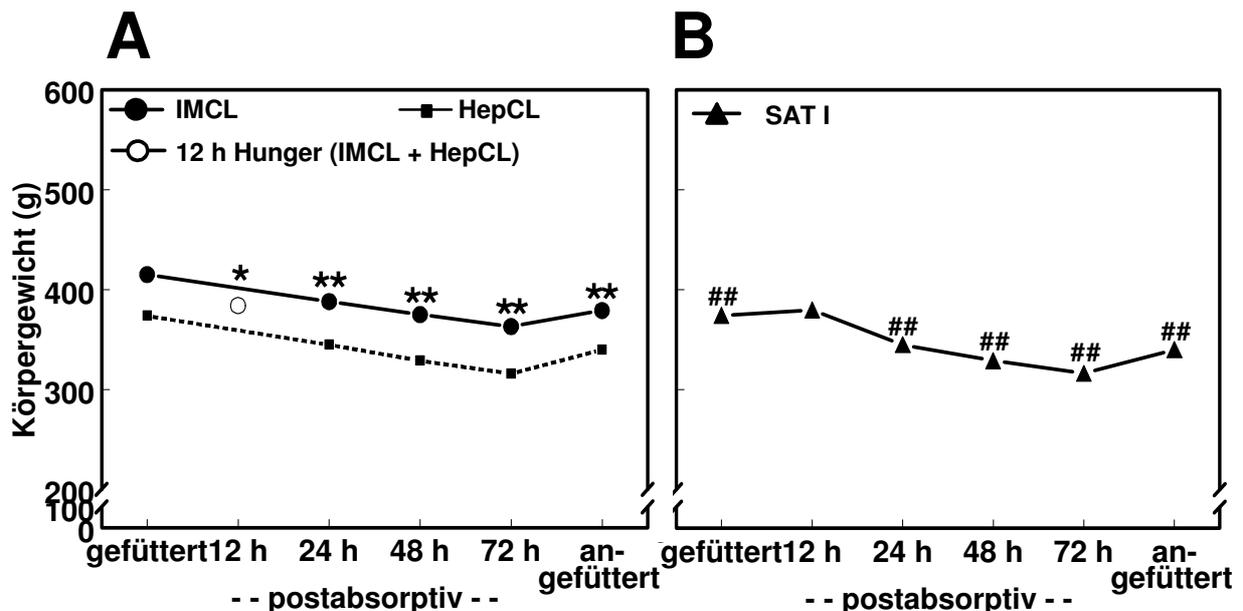


Abb. III.1.1-1 Verlauf des Körpergewichts 16 Wochen alter Wistar-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

- A: NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=8); 12 h postabsorptiv (n=8)
 Für IMCL-Gruppen gilt: * $p < 0,05$ vs. gefüttert; ** $p < 0,001$ vs. gefüttert
 B: Satellitengruppe, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)
 ## $p < 0,001$ vs. IMCL-Gruppe

III.1.2 Stoffwechselfparameter im Serum

Die Blutglukose sank am ersten Tag der postabsorptiven Periode von 5,5 mmol/l im gefütterten Zustand auf einen Nüchtern-Blutglukose-Wert von 4,1 mmol/l. Auf diesem Niveau verharrten die Werte über die gesamte postabsorptive Phase hinweg, um nach Wiederanfütterung auf Ausgangsniveau anzusteigen. Das Absinken der Blutglukose war in Satellitengruppe I nicht so deutlich ausgeprägt wie in den NMR-Gruppen, auch hier kam es jedoch postabsorptiv zu einem Absinken (Abb. III.1.2-1).

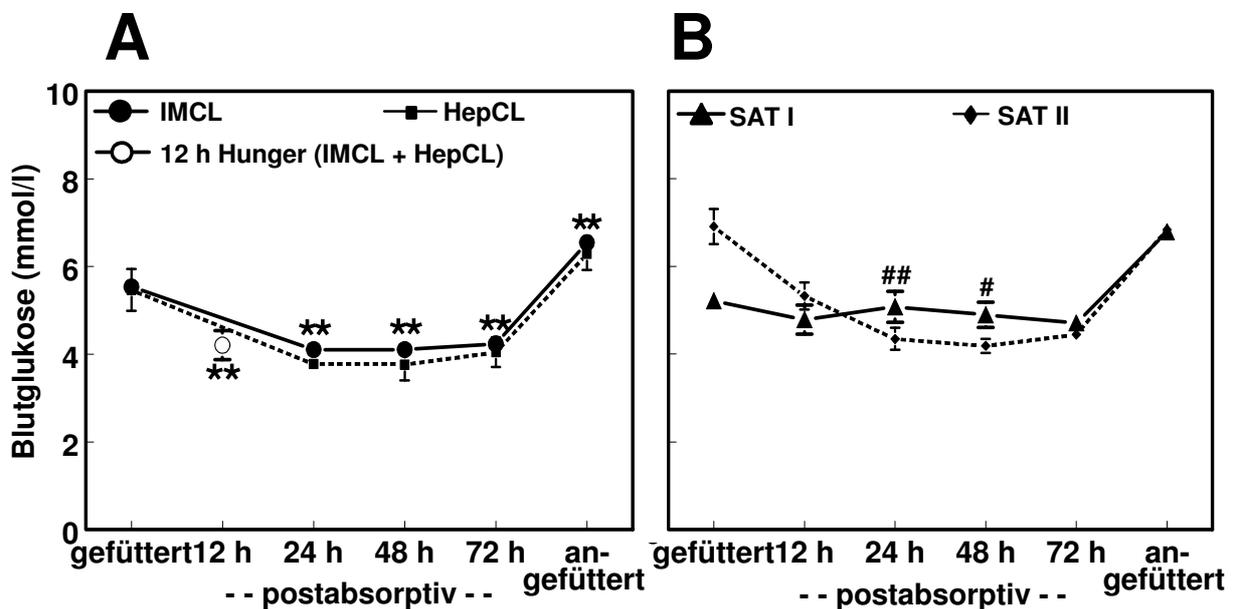


Abb. III.1.2-1 Verlauf der Blutglukose 16 Wochen alter Wistar-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

- A: NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=8); 12 h postabsorptiv (n=8)
Für IMCL-Gruppen gilt: ** p<0,001 vs. gefüttert
- B: Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)
Für SAT I gilt: # p<0,05 vs. IMCL-Gruppe; ## p<0,001 vs. IMCL-Gruppe

Die Insulinspiegel zeigten den gleichen Verlauf wie die Blutglukose. Postabsorptiv sanken die Werte von 1,7 ng/ml auf 0,8 ng/ml ab, verharrten auf diesem Niveau, um bei Anfütterung wieder anzusteigen. In Satellitengruppe I lag der Insulinspiegel bei den gefütterten Tieren niedriger als in den NMR-Gruppen (Abb. III.1.2-2).

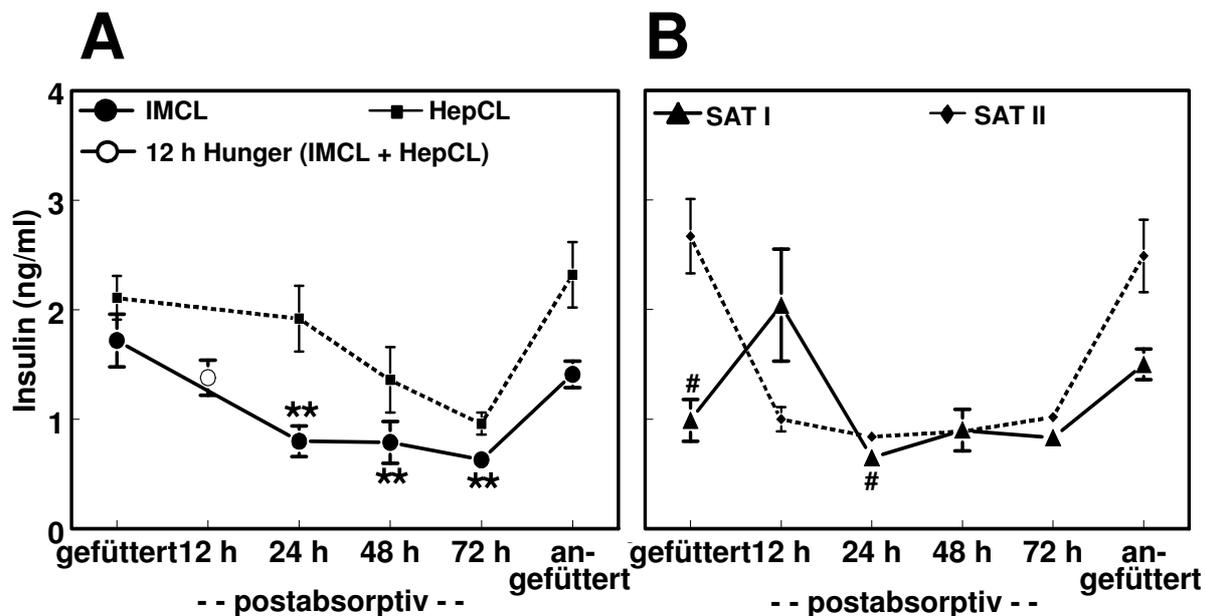


Abb. III.1.2-2 Verlauf der Insulinspiegel 16 Wochen alter Wistar-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

- A: NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=8); 12 h postabsorptiv (n=8)
 Für IMCL-Gruppen gilt: ** p<0,001 vs. gefüttert
- B: Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)
 Für SAT I gilt: # p<0,05 vs. IMCL-Gruppe

Auch die Triglyzeridspiegel sanken während der postabsorptiven Phase deutlich ab. Bei den gefütterten Tieren waren Serumkonzentrationen von 1,3 mmol/l zu messen; postabsorptiv sanken sie auf 0,4 mmol/l ab. Auch hier war ein Wiederanstieg bei Anfütterung der Tiere zu beobachten. Der Verlauf in den Satellitengruppen entsprach weitgehend dem der NMR-Gruppen (Abb. III.1.2-3).

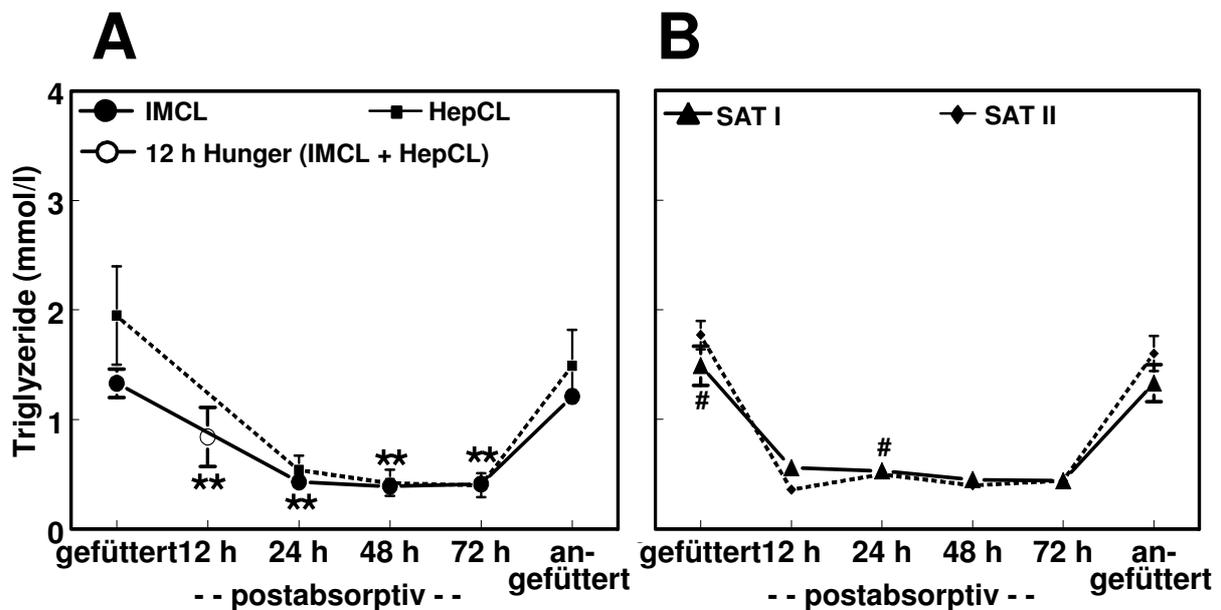


Abb. III.1.2-3 Verlauf der Triglyzeridspiegel 16 Wochen alter Wistar-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

- A: NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=8); 12 h postabsorptiv (n=8)
 Für IMCL-Gruppen gilt: ** p<0,001 vs. gefüttert
- B: Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)
 Für SAT I gilt: # p<0,05 vs. IMCL-Gruppe

Einen den Triglyzeriden entgegengesetzten Verlauf nahmen die Serumspiegel der FFS. Hier war ein Anstieg von 0,2 mmol/l im gefütterten Zustand auf 0,5 mmol/l nach den ersten 24 Stunden der postabsorptiven Phase zu sehen. Auch bei den FFS wurde dieser Wert bis zum 3. Tag der postabsorptiven Phase aufrechterhalten. Nach Wiederanfütterung sanken die Blutspiegel wieder auf den Ausgangswert ab. NMR- und Satellitengruppen zeigten hierbei den gleichen Verlauf (Abb. III. 1.2-4).

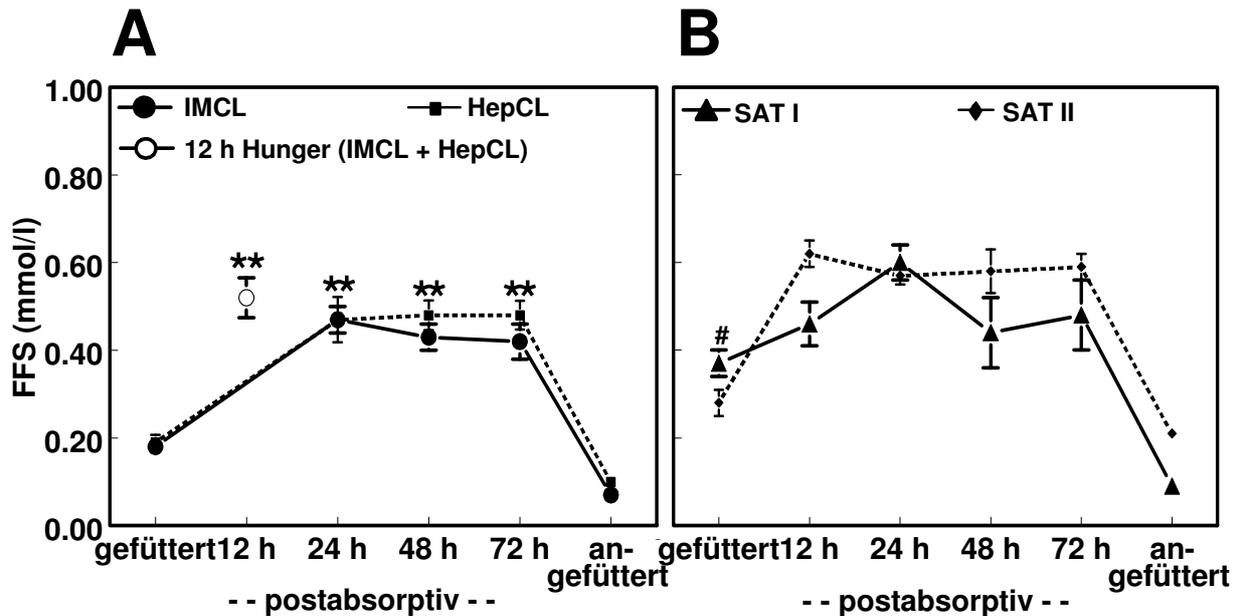


Abb. III.1.2-4 Verlauf der FFS 16 Wochen alter Wistar-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).
 A: NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=8); 12 h postabsorptiv (n=8)
 Für IMCL-Gruppen gilt: ** p<0,001 vs. gefüttert
 B: Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)
 Für SAT I gilt: # p<0,05 vs. IMCL-Gruppe

Ein entsprechender postabsorptiver Anstieg konnte bei den Ketonkörpern beobachtet werden. Der Maximalwert im Verlauf des Versuches wurde hier jedoch erst am zweiten Tag der postabsorptiven Phase erreicht. Die Satellitengruppen verhielten sich analog zu den NMR-Gruppen (Abb. III.1.2-5).

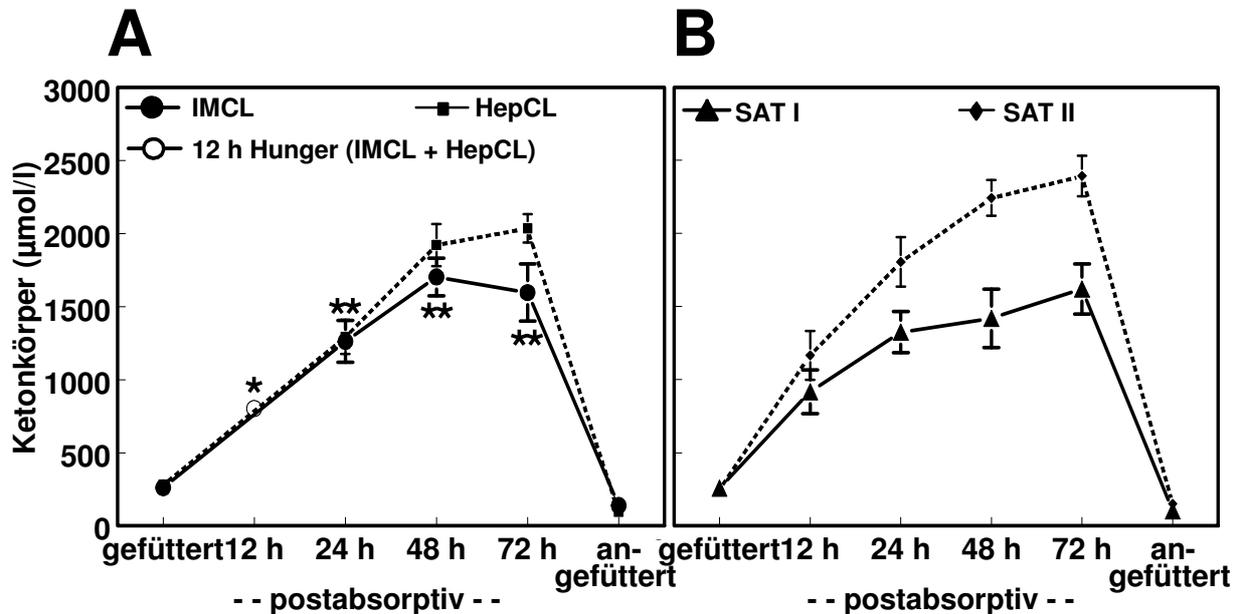


Abb. III.1.2-5 Verlauf der Ketonkörperspiegel 16 Wochen alter Wistar-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

- A: NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=8); 12 h Postabsorptiv (n=8):
Für IMCL-Gruppen gilt: * $p < 0,05$ vs. gefüttert; ** $p < 0,001$ vs. gefüttert
- B: Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)
Für SAT I gilt: # $p < 0,05$ vs. IMCL-Gruppe; ## $p < 0,001$ vs. IMCL-Gruppe)

III.1.3 ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen („NMR-Gruppen“)

III.1.3.a IMCL-Gehalt verschiedener Skelettmuskeltypen

TIB zeigte im Verlauf des Versuches eine deutliche Dynamik: Während der postabsorptiven Phase wurde ein Anstieg auf 250% des gefütterten Wertes beobachtet. Bei Wiederanfütterung ging der IMCL-Gehalt wieder auf den Ausgangswert zurück.

Eine ebensolche Dynamik konnte beim EDL beobachtet werden. Hier stieg der IMCL-Gehalt während der postabsorptiven Phase um 550% an.

Im SOL hingegen war ein solcher Anstieg nicht zu sehen. Die IMCL-Werte blieben über die gesamte Versuchsdauer auf annähernd konstantem Niveau (Abb. III.1.3.a-1).

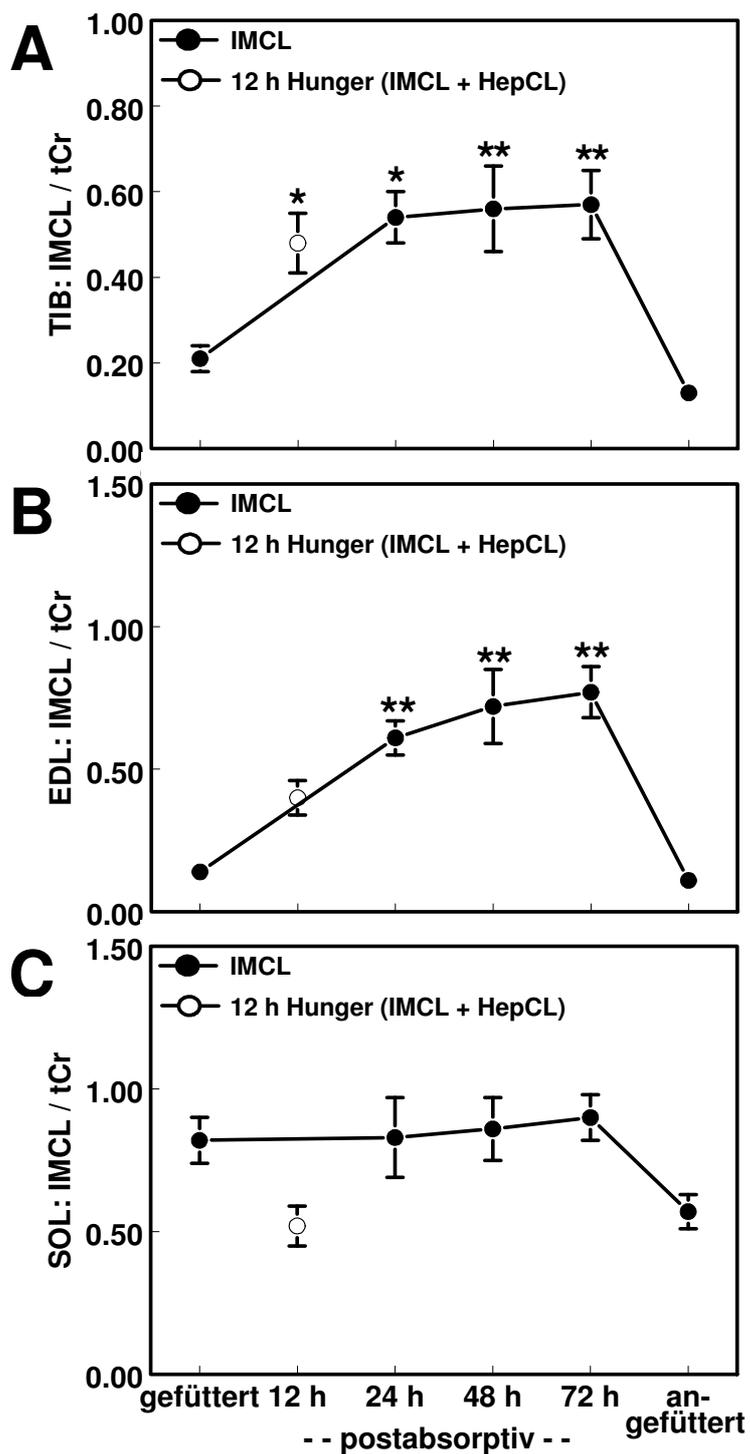


Abb. III.1.3.a-1 Verlauf des IMCL-Gehaltes 16 Wochen alter Wistar-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederaufnahme der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; intraindividuelle Studie (n=8); 12 h postabsorptiv (n=8): * p<0,05 vs. gefüttert; ** p<0,001 vs. gefüttert).

- A: TIB (M. Tibialis Anterior)
- B: EDL (M. Extensor Digitorum Longus)
- C: SOL (M. Soleus)

III.1.3.b Hepatozellulärer Lipidgehalt

Beim HepCL zeigten sich postabsorptiv keine signifikanten Veränderungen. Es war jedoch ein Trend zu einem Anstieg zu Beginn der postabsorptiven Phase erkennbar (Abb. III.1.3.b-1).

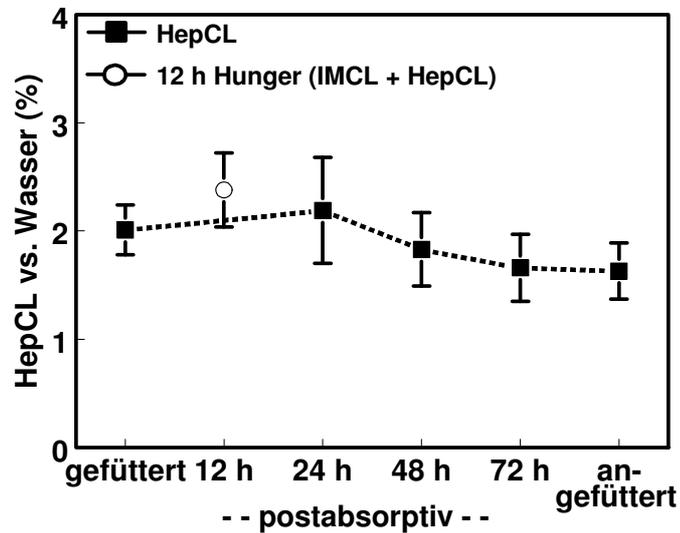


Abb. III.1.3.b-1 Verlauf des HepCL-Gehaltes 16 Wochen alter Wistar-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; intraindividuelle Studie (n=8); 12 h postabsorptiv (n=8)).

III.1.4 Bestimmung biochemischer Parameter Skelettmuskulatur und Leber („Satellitengruppen“)

III.1.4.a Kreatingehalt verschiedener Skelettmuskeltypen

Die Bestimmung des Kreatingehaltes in der Skelettmuskulatur wurde durchgeführt, um die Resultate der IMCL-Messungen zu verifizieren. Der IMCL-Gehalt wurde relativ zum Kreatingehalt angegeben. Es wurde vorausgesetzt, dass der Kreatingehalt konstant ist.

Die biochemischen Untersuchungen ergaben während der Dauer des Versuchs keine signifikanten Veränderungen des tCr-Gehaltes in den einzelnen Skelettmuskeltypen. Damit kann tCr als konstante Referenz für die IMCL-Messung verwendet werden (Tab. III.1.4.a-1).

tCr	Dauer der postabsorptiven Phase µmol/g Trockenmasse					angefüttert
	gefüttert	12h	24h	48h	72h	
TIB	149±1				151±2	151±1
EDL	121±2				121±1	
SOL	92±2		97±1	97±2	95±2	97±2

Tab. III.1.4.a-1 Verlauf von Gesamt-Kreatin (tCr) im M. Tibialis Anterior (TIB), im M. Extensor Digitorum Longus (EDL) sowie im M. Soleus (SOL) 16 Wochen alter Wistar-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte ± SEM der Tiere aus SAT I; interindividuelle Studie (n=8 pro Tag)).

III.1.4.b Malonyl-CoA in Skelettmuskulatur und Leber

Malonyl-CoA wurde als Marker für die Lipidoxidation in Skelettmuskulatur und Leber verwendet. Malonyl-CoA fungiert als endogener Inhibitor der CPT-1 (MCGARRY et al 1978). CPT-1 katalysiert den Transport von LCACoA's durch die äußere Mitochondrienmembran. Hohe Konzentrationen an Malonyl-CoA stellen somit einen Indikator für geringe Lipidoxidation im untersuchten Gewebe dar.

Die Konzentration von Malonyl-CoA verringerte sich in allen 3 untersuchten Skelettmuskeln während der postabsorptiven Phase signifikant, wobei die Änderungen im SOL am geringsten ausfielen. Im TIB und auch im EDL konnte nach Anfütterung ein geringer Anstieg der Malonyl-CoA-Konzentration beobachtet werden (Abb. III.1.4.b-1).

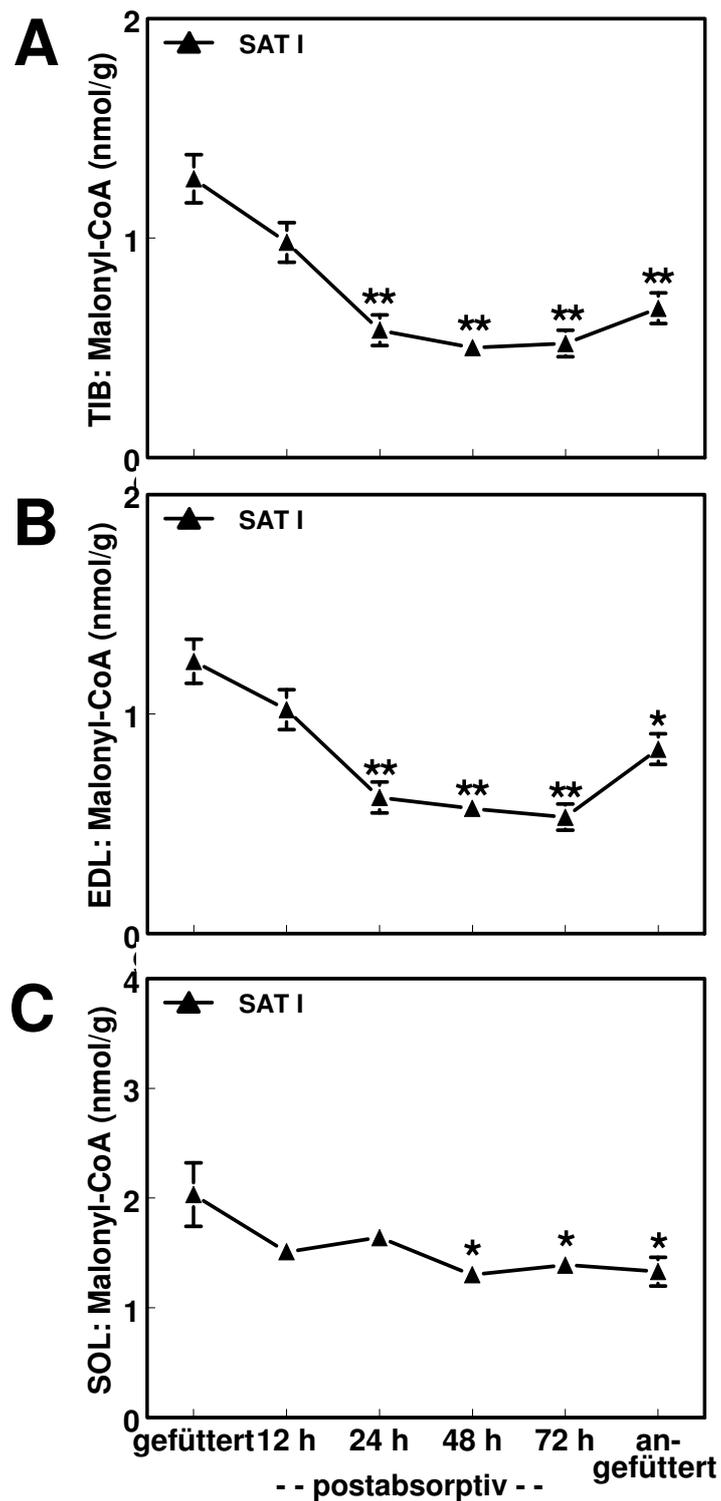


Abb. III.1.4.b-1 Verlauf von Malonyl-CoA 16 Wochen alter Wistar-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere

(Werte sind Mittelwerte \pm SEM; interindividuelle Studie (n=8 pro Tag)

* p<0,05 vs. gefüttert; ** p<0,001 vs. gefüttert).

A: TIB (M. Tibialis Anterior)

B: EDL (M. Extensor Digitorum Longus)

C: SOL (M. Soleus)

In der Leber zeigte sich eine grundsätzlich andere Dynamik als in der Skelettmuskulatur. Während sich postabsorptiv keine Konzentrationsänderung gegenüber dem gefütterten Zustand ergab, konnte bei Wiederanfütterung eine hochsignifikante Erhöhung des Malonyl-CoA Spiegels festgestellt werden (Abb. III.1.4.b-2).

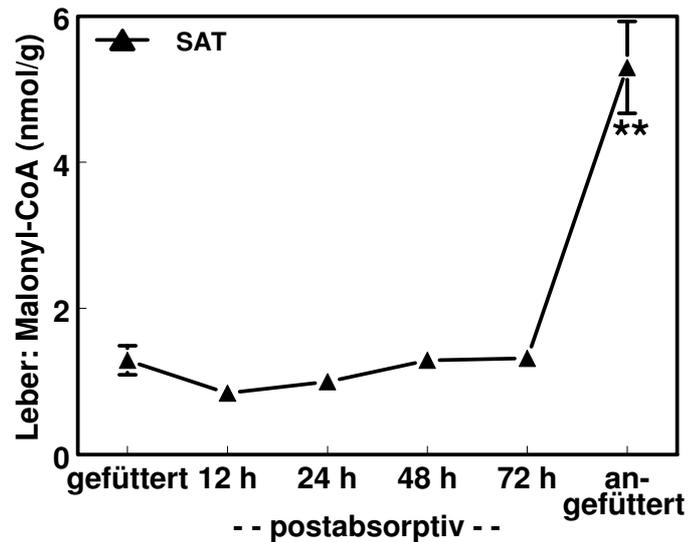


Abb. III.1.4.b-2 Verlauf von Malonyl-CoA in der Leber 16 Wochen alter Wistar-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; interindividuelle Studie (n=8 pro Tag); ** p<0,001 vs. gefüttert).

III.1.4.c LCACoA-Gehalt in Skelettmuskel und Leber

Der Gesamt-LCACoA-Gehalt, dargestellt als Summe aus: Palmitoyl-CoA (C16:0), Palmitoleoyl-CoA (C16:1), Oleoyl-CoA (C18:1), Linoleoyl-CoA (C18:2) und Arachidonoyl-CoA (C20:4), im LONG lag im gefütterten Zustand bei 16 nmol/g Trockenmasse und änderte sich während der gesamten Versuchsdauer nicht signifikant. Postabsorptiv war ein tendenzieller Anstieg zu erkennen.

Auch die Zusammensetzung der einzelnen Fettsäuren änderte sich während der postabsorptiven Phase nicht.

Als Hauptfettsäuren (über 3 nmol/g Trockenmasse) ließen sich Palmitoyl-CoA und Oleoyl-CoA identifizieren. Linoleoyl-CoA und Arachidonoyl-CoA lagen in der Summe bei ca. 6 nmol/g. In nur sehr geringen Mengen (unter 1 nmol/g Trockenmasse) konnte Palmitoleoyl-CoA nachgewiesen werden (Tab. III.1.4.c-1).

LCACoA-Spezies	Dauer der postabsorptiven Phase nmol/g Trockenmasse					angefüttert
	gefüttert	12h	24h	48h	72h	
C16:0	2.9±0.3	3,7±0,5	3.3±0.3	3.9±0.4	3.5±0.5	2.7±0.2
C16:1	0.8±0.1	0,8±0,0	1.0±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1	0.6±0.0
C18:1	7.3±0.7	5,1±0.4	6.8±0.6	8.4±0.6	7.6±0.8	5.2±0.3
C18:2 + C20:4	4.8±0.6	4,0±0,3	6,1±0,6	7,3±0,8*	6,2±0,9	4,0±0,4
Gesamt	15,8±1,4	13,7±1,1	17,2±1,5	20,5±1,6	18,2±2,2	12,4±0,9

Tab. III.1.4.c-1 Verlauf der LCACoA im M. Longissimus Dorsi 16 Wochen alter Wistar-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte ± SEM der Tiere aus SAT I; interindividuelle Studie (n=8 pro Tag): *p<0,05 vs. gefüttert).

Die LCACoA-Konzentrationen in der Leber lagen insgesamt deutlich höher als im LONG.

Der Gesamtgehalt der gemessenen LCACoA, dargestellt als Summe aus Palmitoyl-CoA, Palmitoleoyl-CoA, Stearoyl-CoA (C18:0), Oleoyl-CoA, Linoleoyl-CoA und Arachidonoyl-CoA, stieg nach 24-stündiger Nahrungskarenz hochsignifikant an. Im weiteren Verlauf der postabsorptiven Phase war ein leichtes Absinken gegenüber

dem ersten postabsorptiven Tag zu beobachten. Bei Wiederaanfütterung sank die Gesamt-LCACoA-Konzentration auf den Ausgangswert ab.

Ein der LCACoA-Gesamtkonzentration entsprechendes Profil zeigten Stearoyl-CoA, Linoleoyl-CoA und Arachidonoyl-CoA. Die Palmitoleoyl-CoA-Konzentration in der Leber hingegen sank postabsorptiv signifikant ab und erreichte bei Wiederaanfütterung annähernd das doppelte des Ausgangswertes. Die Konzentrationen von Palmitoyl-CoA sowie Oleoyl-CoA veränderten sich während der postabsorptiven Phase nicht signifikant.

Den Hauptanteil der aktivierten Fettsäuren stellten mit über 50 nmol/g Trockenmasse im gefütterten Zustand Linoleoyl-CoA und Oleoyl-CoA dar. Es folgten mit 20-50 nmol/g Palmitoyl-CoA, Arachidonoyl-CoA sowie Palmitoleoyl-CoA. Den geringsten Anteil LCACoA hatte im gefütterten Zustand Stearoyl-CoA.

Postabsorptiv veränderte sich in der Leber das Fettsäuremuster nur geringfügig. Der Anteil an Stearoyl-CoA, Linoleoyl-CoA und Arachidonoyl-CoA erhöhte sich gegenüber den anderen Fettsäuren. Palmitoleoyl-CoA war nun die aktivierte Fettsäure mit dem geringsten Anteil an der Gesamtmenge (Tab. III.1.4.c-2).

LCACoA-Spezies	Dauer der postabsorptiven Phase nmol/g Trockenmasse					
	gefüttert	12h	24h	48h	72h	angefüttert
C16:0	48,7±3,5	50,4±2,8	57,6±3,0	50,6±3,6	46,4±6,1	73,8±4,6**
C16:1	21,8±5,0	8,6±0,7*	7,8±0,6*	4,3±0,2**	4,8±0,5**	41,9±5,6**
C18:0	5,7±0,4	15,7±1,2**	18,6±0,7**	17,9±0,8**	18,6±0,5**	8,5±0,6
C18:1	64,9±6,8	53,9±3,2	67,9±3,8	49,2±2,1	48,6±4,4	74,3±5,4
C18:2	82,6±11,2	121±5	237±20**	164±7**	153±19*	62,3±7,4
C20:4	30,9±3,4	66,6±3,6**	81,1±3,3**	70,3±2,4**	66,6±2,1**	36,1±2,2
Gesamt	255±24	316±10	470±28**	356±13*	338±30	297±15

Tab. III.1.4.c-2 Verlauf der LCACoA in der Leber 16 Wochen alter Wistar-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederaanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte ± SEM der Tiere aus SAT I; interindividuelle Studie; (n=8 pro Tag): *p<0,05 vs. gefüttert; **p<0,001 vs. gefüttert).

III.1.4.d Lebergewicht, Glykogen-, Wasser-, und Lipidgehalt der Leber

Diese Parameter wurden zur Verifizierung der ¹H-spektroskopischen HepCL-Messungen analysiert. Der HepCL-Gehalt wurde im Verhältnis zum Wassergehalt angegeben. Da postabsorptiv der Glykogengehalt der Leber sinkt und 1 g Glykogen ca. 3 g Wasser (PUCKETT et al, 1932) binden kann, sollte nachgewiesen werden, ob es postabsorptiv zu einer Änderung des Wassergehaltes kommt.

Postabsorptiv sank das Lebergewicht auf 50% des Ausgangsgewichtes ab. Nach Wiederanfütterung der Tiere erreichte das Gewicht der Leber wieder den Ausgangswert (Tab. III.1.4.d).

Der Wasseranteil in der Leber blieb über den gesamten Versuchszeitraum hinweg konstant. Somit kann bei der HepCL-Messung das Wasser als Bezugsgröße für das Methylensignal des Lipids verwendet werden (Tab. III.1.4.d).

Das Glykogen in der Leber war bereits nach 12-stündiger Nahrungskarenz fast vollständig abgebaut. Nach Wiederanfütterung lagen die Werte signifikant über dem Ausgangsniveau (Tab. III.1.4.d).

Der auf 1 g Leber bezogene Triglyzeridgehalt änderte sich über den beobachteten Versuchszeitraum hinweg nicht signifikant. Es konnte jedoch ein Trend zu einem postabsorptiven Anstieg beobachtet werden. Der Triglyzeridgehalt bezogen auf eine Gewichtseinheit verifiziert die bei den HepCL-Messungen gewonnenen Daten (Tab. III.1.4.d).

Bezogen auf die Gesamtleber ergaben sich im Versuchsverlauf ebenfalls keine Änderungen des Triglyzeridgehaltes. Bei Wiederanfütterung war jedoch ein tendenzieller Anstieg der Werte zu sehen. Der Triglyzeridgehalt, bezogen auf das Gesamtorgan, stellt den metabolisch relevanten Parameter für den Organismus dar (Tab. III.1.4.d).

	Dauer der postabsorptiven Phase					
	gefüttert	12h	24h	48h	72h	angefüttert
Gewicht (g)	15,4 ±0,3	10,8 ±0,2**	9,7 ±0,2**	8,7 ±0,1**	8,0 ±0,2**	14,9 ±0,4
Wasser (mg / g Feuchtgewicht)	684 ±2	694 ±3	692 ±3	695 ±3	691 ±4	694 ±3
Glykogen (mg / g Feuchtgewicht)	71,46 ±2,01	1,73 ±0,56**	0,12 ±0,02**	0,54 ±0,20**	3,31 ±0,77**	97,28 ±3,14**
Triglyzeride (mg / g Feuchtgewicht)	6,52 ±0,57	12,36 ±2,07	11,47 ±1,49	11,74 ±1,84	13,24 ±2,48	10,59 ±1,21
Triglyzeride (mg / Leber)	99,8 ±8,3	133,0 ±21,8	113,5 ±16,0	102,2 ±16,0	105,7 ±19,7	157,2 ±17,4

Tab. III.1.4.d Lebergewicht sowie Wasser-, Glykogen- und Triglyzeridgehalt der Leber 16 Wochen alter Wistar-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte ± SEM der Tiere aus SAT II; interindividuelle Studie; (n=8 pro Tag): **p<0,001 vs. gefüttert).

III.2 Postabsorptionsstudie bei 8 Wochen alten ZDF-Ratten

Die Tierbestellungen erfolgten so, dass diese bei Versuchsbeginn 8 Wochen alt sein sollten. Die Tiere der IMCL- und der HepCL-Gruppe entstammten unterschiedlichen Tieranforderungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Da das Körpergewicht der Tiere beider Gruppen sich deutlich voneinander unterschied und auch die Glukose- und die Insulinspiegel bei der IMCL-Gruppe höher lagen als bei der HepCL-Gruppe, muss davon ausgegangen werden, dass die Tiere der HepCL-Gruppe jünger waren als diejenigen der IMCL-Gruppe.

III.2.1 Physiologische Parameter

Das Körpergewicht nahm sowohl bei den schlanken als auch bei den obesen ZDF-Ratten bis zum dritten Tag der postabsorptiven Periode ab. Die größte Gewichtsabnahme war dabei nach den ersten 24 Stunden der Nahrungskarenz zu beobachten. Das Körpergewicht der obesen Tiere lag hierbei über den gesamten Versuchszeitraum hinweg höher als das der schlanken Kontrolltiere. Die Körpergewichtsentwicklung verlief in NMR- und Satellitengruppe annähernd identisch (Abb. III.2.1-1).

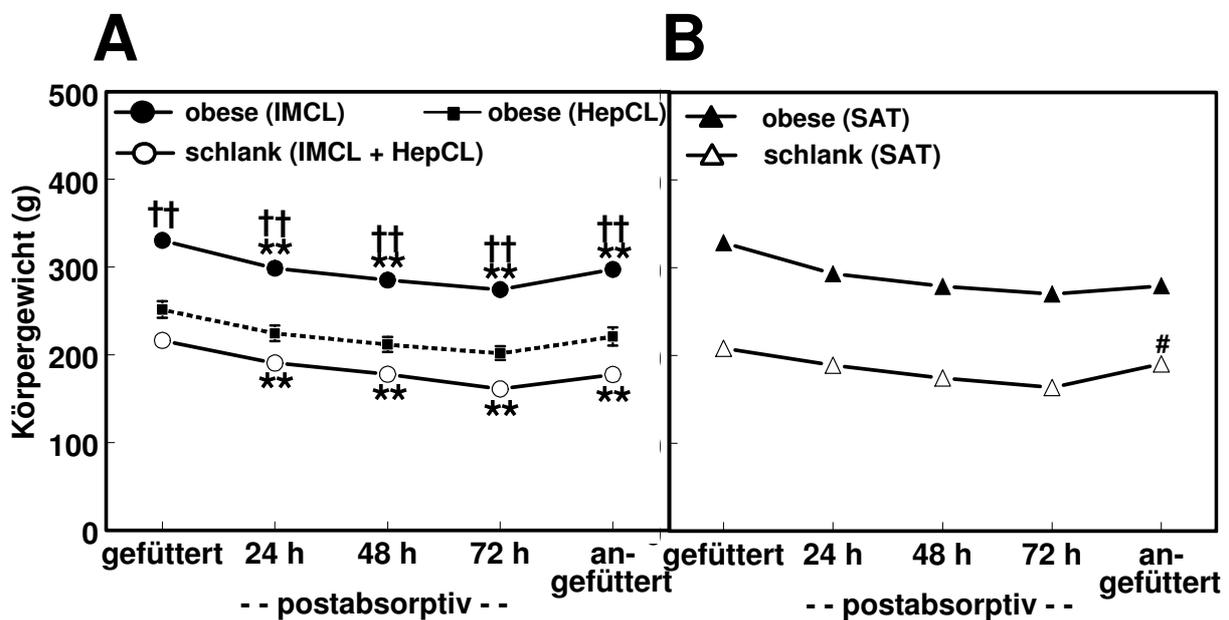


Abb. III.2.1-1 Verlauf des Körpergewichts 8 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederaufnahrung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

A: NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=8):

Für IMCL-Gruppen gilt: ** p<0,001 vs. gefüttert; †† p<0,001 vs. schlank

B: Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)

III.2.2 Stoffwechselfparameter im Serum

Postabsorptiv sank die Blutglukose bei beiden untersuchten Genotypen ab. Die obesen Tiere wiesen mit 13 mmol/l im gefütterten Zustand, sowie 10 mmol/l nach Wiederanfütterung, einen gegenüber den schlanken Ratten signifikant höheren Blutglukosespiegel auf. Die Blutglukose der obesen Tiere unterschied sich postabsorptiv nicht von den Blutspiegeln der Kontrollgruppe. Die Blutglukosespiegel der Tiere aus den Satellitengruppen lagen weitgehend auf dem Niveau der NMR-Gruppen (Abb. III.2.2-1).

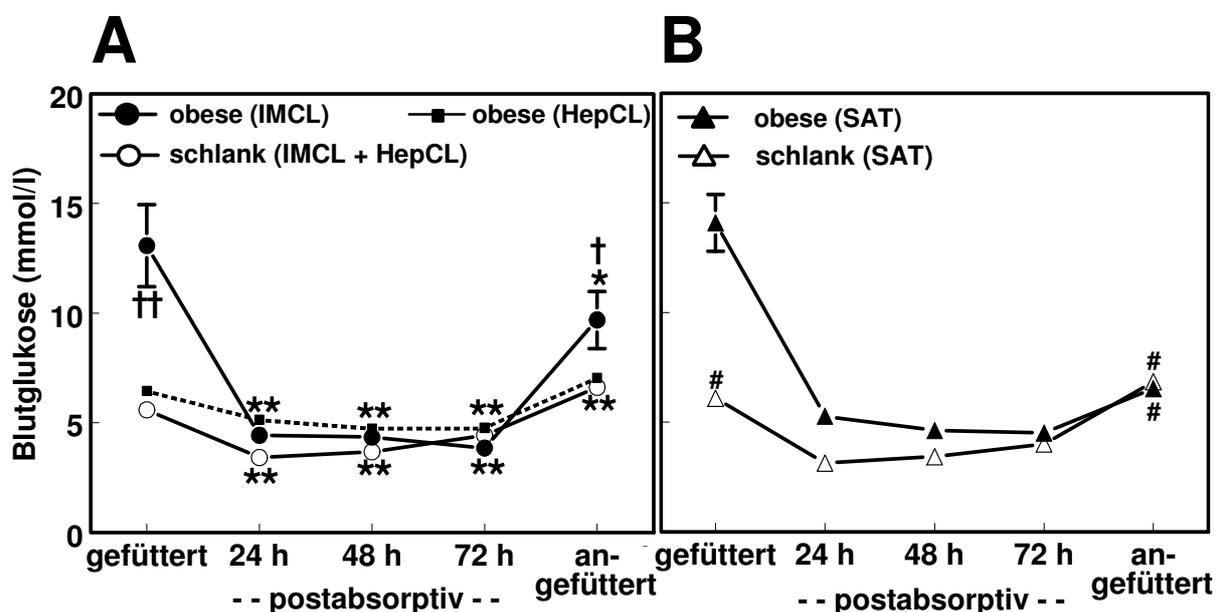


Abb. III.2.2-1 Verlauf der Blutglukosespiegel 8 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

A: NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=8):

Für IMCL-Gruppen gilt: * p<0,05 vs. gefüttert; ** p<0,001 vs. gefüttert;

† p<0,05 vs. schlank; †† p<0,001 vs. schlank

B: Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)

p<0,05 vs. IMCL-Gruppen

Die Insulinspiegel verhielten sich analog zur Blutglukose: Auch hier war postabsorptiv ein Absinken sowie ein Wiederanstieg nach Ende der Nahrungskarenz zu beobachten. Der Insulinspiegel der obesen ZDF-Ratten war gegenüber dem der schlanken Tiere sowohl am ersten als auch am letzten Versuchstag signifikant erhöht. Diese erhöhten Insulinspiegel sind Ausdruck der Insulinresistenz bei diesen Tieren. Der Verlauf des Insulinspiegels war bei der NMR- und der Satellitengruppe annähernd identisch (Abb. III.2.2-2).

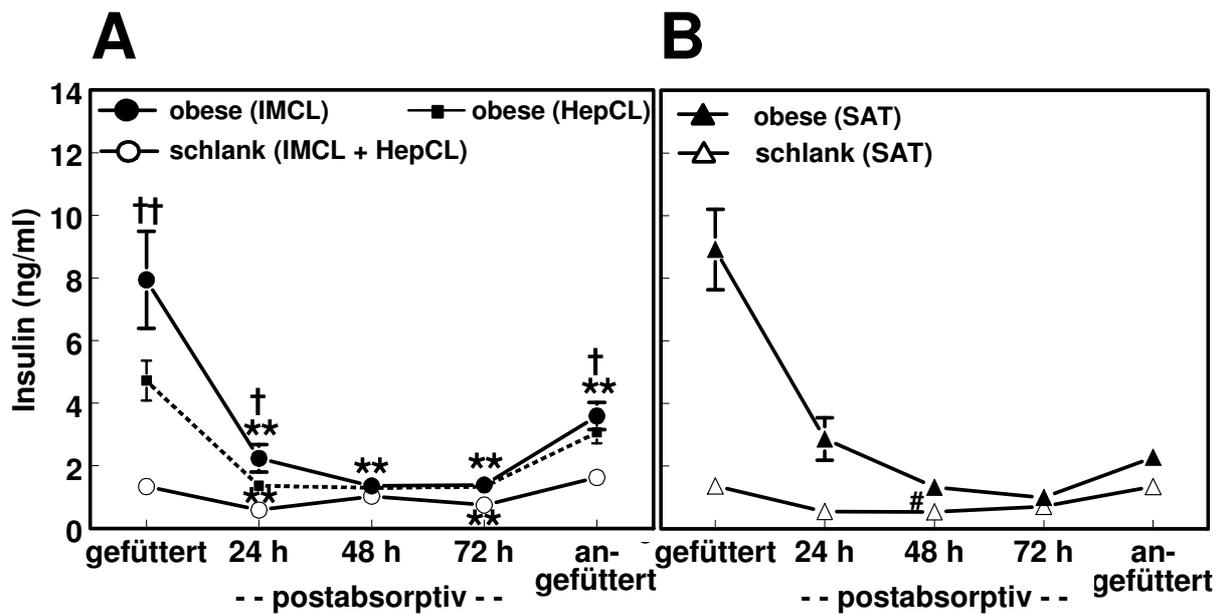


Abb. III.2.2-2 Verlauf der Insulinspiegel 8 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

A: NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=8):

Für IMCL-Gruppen gilt: ** p<0,001 vs. gefüttert; † p<0,05 vs. schlank

B: Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)

p<0,05 vs. IMCL-Gruppen

Die im Serum gemessenen Triglyzeridspiegel sanken postabsorptiv in beiden Tiergruppen ab. Während der gesamten Versuchsdauer lagen die Blutwerte der obesen Tiere signifikant höher als diejenigen der Kontrollgruppe. Nach 24-stündiger Wiederanfütterung war bei beiden Gruppen ein Anstieg gegenüber dem letzten Tag der postabsorptiven Periode zu beobachten. Am ersten und am letzten Versuchstag konnten geringe Unterschiede zwischen den NMR- und den Satellitengruppen gemessen werden (Abb. III.2.2-3).

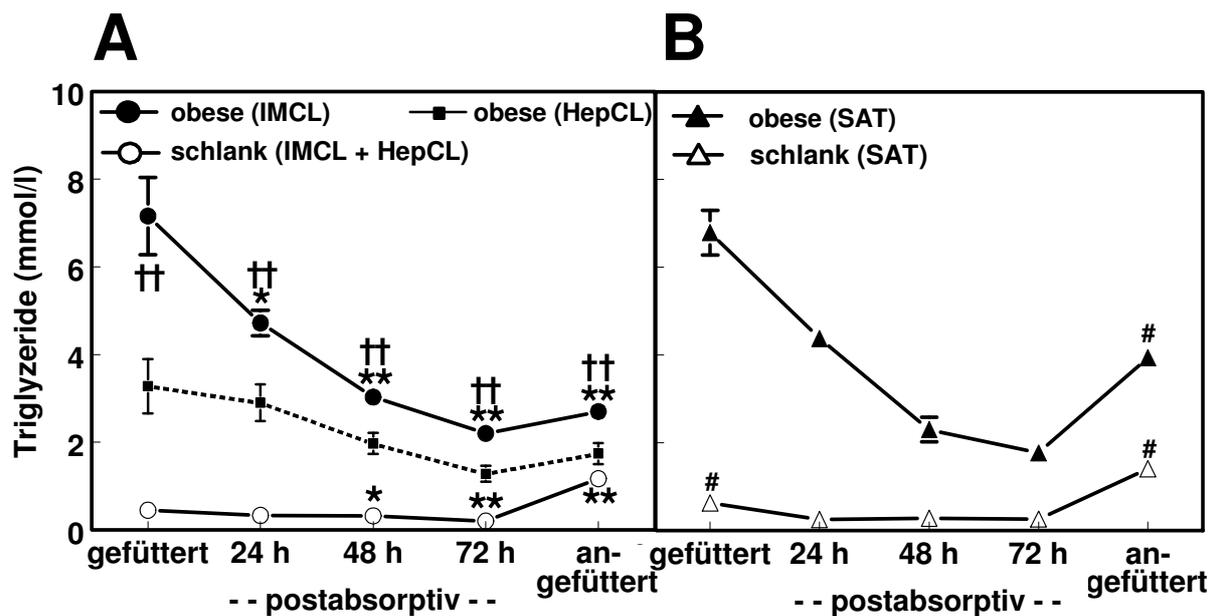


Abb. III.2.2-3 Verlauf der Triglyzeridspiegel 8 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

- A:** NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=8):
 Für IMCL-Gruppen gilt: * p<0,05 vs. gefüttert; ** p<0,001 vs. gefüttert;
 †† p<0,001 vs. schlank
- B:** Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)
 # p<0,05 vs. IMCL-Gruppen

Die Blutspiegel der FFS verhielten sich umgekehrt zu denen der Triglyzeriden. Hier konnte postabsorptiv ein Anstieg der Blutspiegel beobachtet werden. Bei den schlanken Tieren fiel auf, dass die Blutspiegel während der postabsorptiven Phase nicht auf einem Plateau verharrten, sondern am dritten Tag der postabsorptiven Periode leicht absanken. Ein weiteres, deutliches Absinken der Serumspiegel der FFS konnte in beiden Gruppen bei Wiederaanfütterung vermerkt werden. Die bei der NMR-Gruppe gemessenen Konzentrationen unterschieden sich nicht von denen der Satellitengruppe (Abb. III.2.2-4).

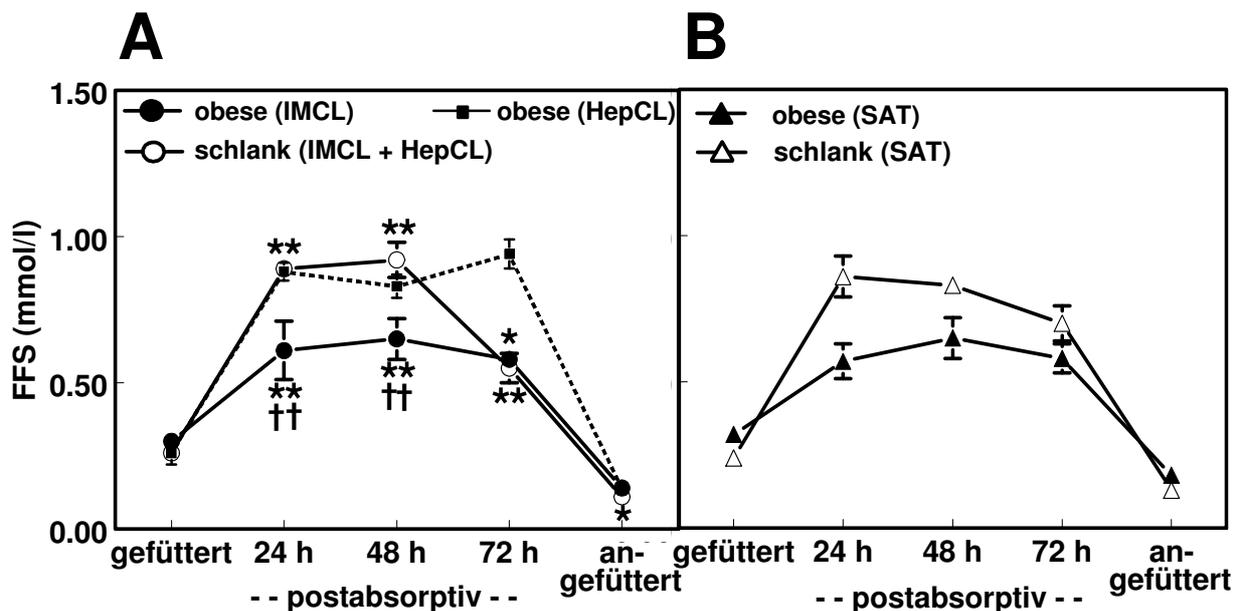


Abb. III.2.2-4 Verlauf der FFS 8 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederaanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

A: NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=8):

Für IMCL-Gruppen gilt: * $p < 0,05$ vs. gefüttert; ** $p < 0,001$ vs. gefüttert;

†† $p < 0,001$ vs. schlank

B: Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)

Die Ketonkörperspiegel stiegen postabsorptiv bei beiden Gruppen hochsignifikant an. Der höchste Wert konnte bei den schlanken Tieren bereits am ersten Tag der postabsorptiven Periode gemessen werden, bei den obesen Ratten jedoch erst nach 72-stündiger Nahrungskarenz. Am fünften Versuchstag sanken die Ketonkörper wieder auf Ausgangsniveau ab. Der Verlauf der Ketonkörperspiegel war in NMR- und Satellitengruppe gleich. Unterschiede waren lediglich in der Höhe des postabsorptiven Anstiegs zu beobachten (Abb. III.2.2-5).

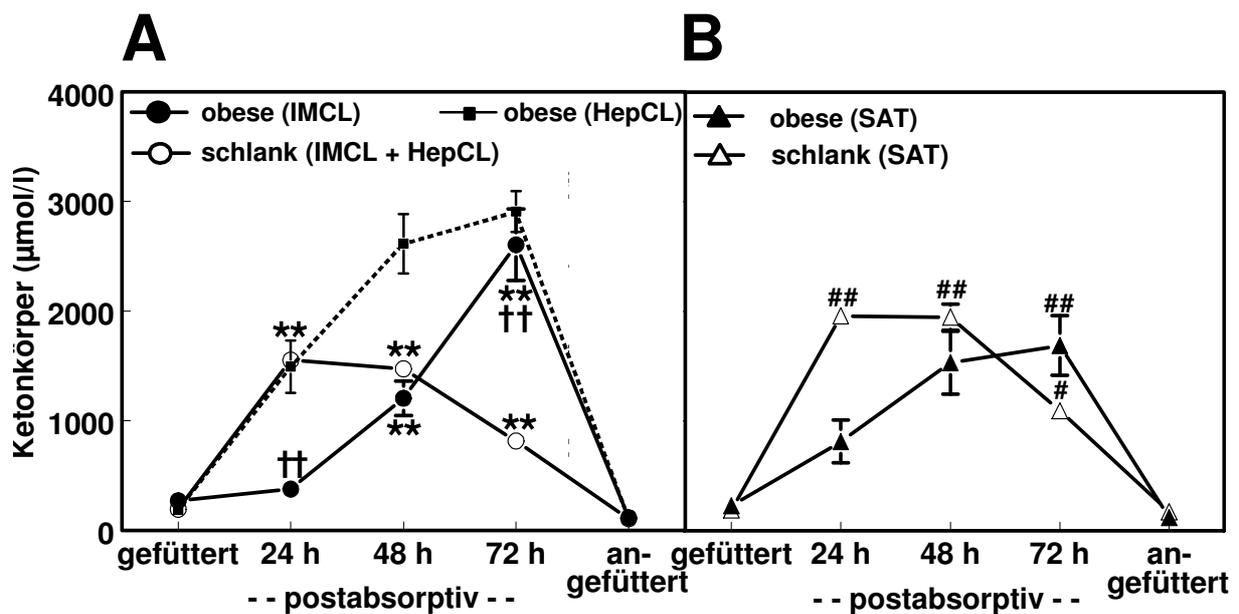


Abb. III.2.2-5 Verlauf der Ketonkörperspiegel 8 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

A: NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=8):

Für IMCL-Gruppen gilt: ** p<0,001 vs. gefüttert; †† p<0,001 vs. schlank

B: Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)

p<0,05 vs. IMCL-Gruppen; ## p<0,001 vs. IMCL-Gruppen

III.2.3 ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen („NMR-Gruppen“)

III.2.3.a IMCL-Gehalt verschiedener Skelettmuskeltypen

Die IMCL-Werte der schlanken Tiere lagen im gesamten Versuchszeitraum niedriger als die der obesen Ratten.

Das IMCL nahm im TIB bei beiden Gruppen während der postabsorptiven Phase deutlich zu. Am ersten Versuchstag lagen die IMCL-Werte der obesen Tiere höher als diejenigen der schlanken Kontrollen. Postabsorptiv folgte sodann ein Anstieg des IMCL um 250 %. Bei den schlanken Tieren war dieser IMCL-Anstieg mit annähernd 500 % noch deutlicher.

Eine vergleichbare, wenn auch nicht so deutliche Dynamik war im EDL zu erkennen. Auch hier lag der IMCL-Gehalt der obesen Tiere über dem Niveau der Kontrollgruppe.

Im SOL traten bei den insulinresistenten Tieren im Verlauf der gesamten postabsorptiven Periode keine signifikanten Veränderungen auf. Lediglich bei Wiederanfütterung kam es zu einem geringfügigen Absinken des IMCL-Gehaltes. Bei der schlanken Kontrollgruppe kam es dagegen zunächst zu einem leichten Anstieg des IMCL-Gehaltes. Im weiteren Verlauf der postabsorptiven Phase nahm der IMCL-Gehalt jedoch deutlich ab (Abb. III.2.3.a-1).

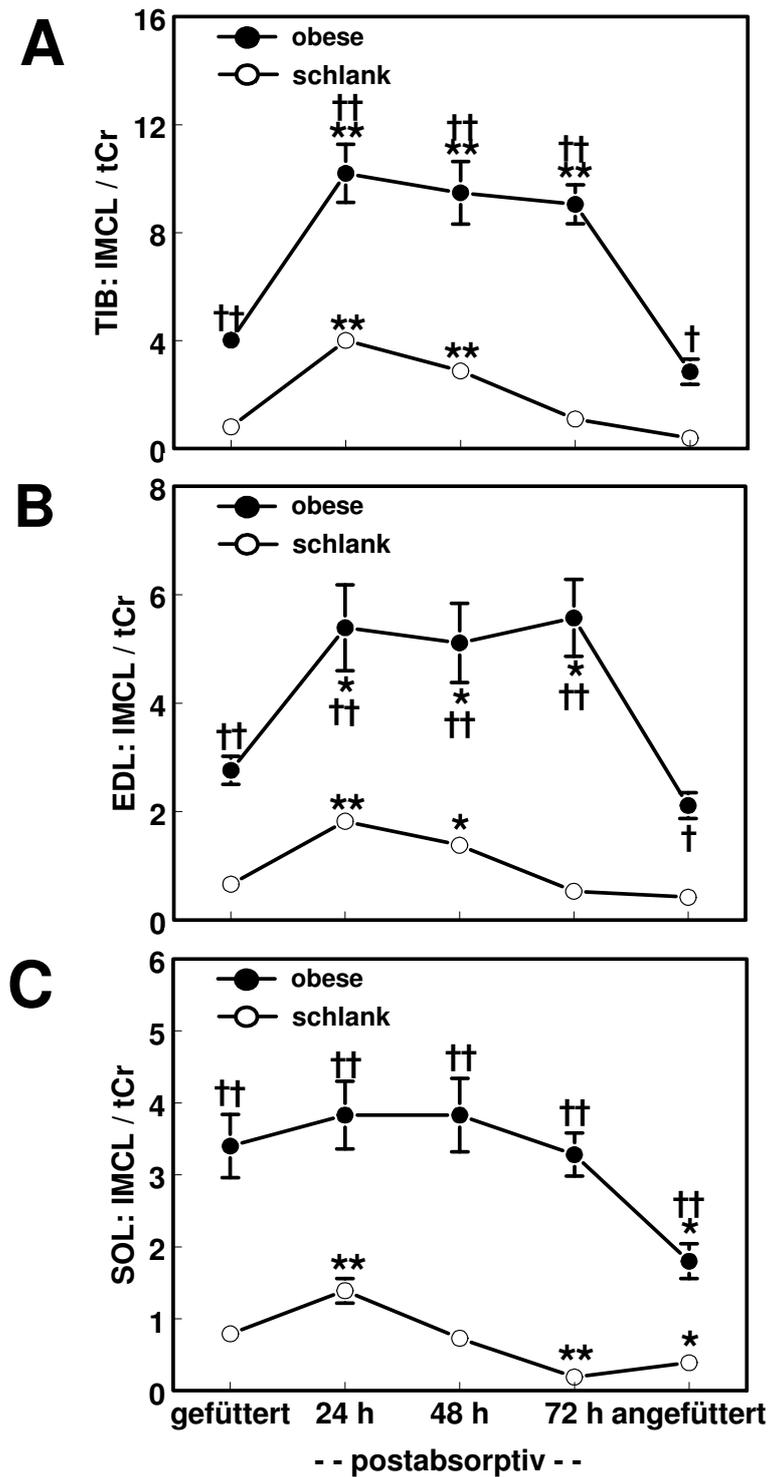


Abb. III.2.3.a-1 Verlauf des IMCL-Gehaltes 8 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere

(Werte sind Mittelwerte \pm SEM;

* $p < 0,05$ vs. gefüttert; ** $p < 0,001$ vs. gefüttert; † $p < 0,05$ vs. schlank;

†† $p < 0,001$ vs. schlank; intraindividuelle Studie; $n=8$).

A: TIB (M. Tibialis Anterior)

B: EDL (M. Extensor Digitorum Longus)

C: SOL (M. Soleus)

III.2.3.b Hepatozellulärer Lipidgehalt

Der ^1H -NMR-spektroskopisch gemessene HepCL-Gehalt sank bei den schlanken Tieren am dritten Tag der postabsorptiven Periode geringgradig ab, war ansonsten aber über den gesamten Versuchszeitraum hinweg unverändert. Bei den obesen Ratten hingegen konnte postabsorptiv ein deutlicher Anstieg des HepCL beobachtet werden. Bei Wiederanfütterung sank der HepCL-Gehalt auf den Ausgangswert ab. Der HepCL-Gehalt lag bei den obesen Tiere während des gesamten Versuches höher als bei der schlanken Kontrollgruppe (Abb. III.2.3.b-1).

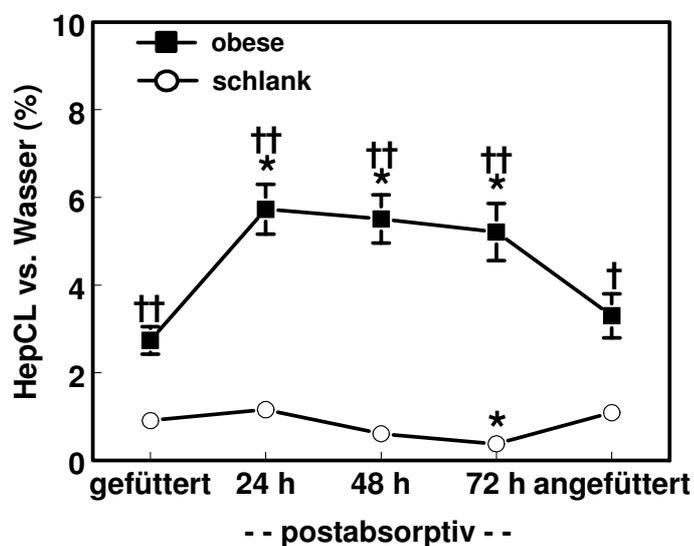


Abb. III.2.3.b-1 Verlauf des HepCL-Gehaltes 8 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. gefüttert; † $p < 0,05$ vs. schlank; †† $p < 0,001$ vs. schlank; intraindividuelle Studie; $n=8$).

III.2.4 Bestimmung biochemischer Parameter in Skelettmuskulatur und Leber („Satellitengruppen“)

III.2.4.a Kreatingehalt verschiedener Skelettmuskeltypen

Wie schon bei den Wistar-Ratten wurde der tCr-Gehalt in der Skelettmuskulatur auch hier zur Verifizierung der IMCL-Messungen bestimmt. Dabei sollte der tCr-Gehalt im Versuchsverlauf möglichst konstant bleiben, um als Referenz für das Methylensignal des IMCL dienen zu können.

Der tCr-Gehalt der untersuchten Skelettmuskeltypen blieb postabsorptiv bis auf wenige Ausnahmen konstant. Zwischen den schlanken und den obesen Ratten traten in Einzelfällen signifikante Unterschiede auf. Im SOL waren deutlich geringere tCr-Konzentrationen zu messen als in den beiden anderen Muskelfasertypen. Die Werte der obesen Tiere lagen dabei höher als die der schlanken Kontrollen (Tab. III.2.4.a-1).

Postabsorptiv kam es in Einzelfällen zu signifikant erhöhten tCr-Konzentrationen. Da jedoch in dieser Phase IMCL ebenfalls anstieg, bleibt die Grundaussage trotz dieser Veränderungen gleich. Die Abweichungen sind quantitativ sehr gering, so dass auch die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nur von untergeordneter Bedeutung sein dürften.

tCr		Dauer der postabsorptiven Phase μmol/g Trockenmasse				
		gefüttert	24h	48h	72h	angefüttert
TIB	schlank	124,6±0,7			140,8±1,3 **	136,6±1,0 **
	obese	135,9±2,2 ††			135,2±2,8 †	139,5±1,6
EDL	schlank	123,3±2,0			131,8±1,3 *	124,7±1,7
	obese	125,9±2,1			125,6±2,3 †	123,8±0,9
SOL	schlank	83,3±2,4			84,8±0,8	91,8±1,6
	obese	89,0±1,1			93,9±1,6 †	99,0±4,6 †*

Tab. III.2.4.a-1 Verlauf von Gesamt-Kreatin (tCr) im M. Tibialis Anterior (TIB), im M. Extensor Digitorum Longus (EDL) sowie im M. Soleus (SOL) 8 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte ± SEM; * p<0,05 vs. gefüttert; ** p<0,001 vs. gefüttert; † p<0,05 vs. schlank; †† p<0,001 vs. schlank; interindividuelle Studie; n=8).

III.2.4.b Malonyl-CoA in Skelettmuskulatur und Leber

Der Malonyl-CoA-Gehalt wurde, wie schon bei den Wistar-Ratten als Marker für die Lipidoxidation bestimmt.

Der Gehalt an Malonyl-CoA nahm bei den schlanken Tieren sowohl im TIB als auch im EDL postabsorptiv ab. Bei Wiederanfütterung am letzten Versuchstag stieg die Malonyl-CoA-Konzentration in beiden Muskeln wieder an.

Bei den obesen Ratten war dieser Verlauf nur im TIB zu beobachten, während im EDL über den gesamten Versuchszeitraum keine Konzentrationsänderungen zu beobachten waren.

Annähernd über den gesamten Versuchszeitraum waren bei den obesen Tieren die höheren Konzentrationen an Malonyl-CoA zu messen.

Im SOL blieb die Konzentration an Malonyl-CoA sowohl bei den schlanken als auch bei den obesen Tieren konstant. Die beiden Gruppen unterschieden sich nur geringfügig voneinander (Abb. III.2.4.b-1).

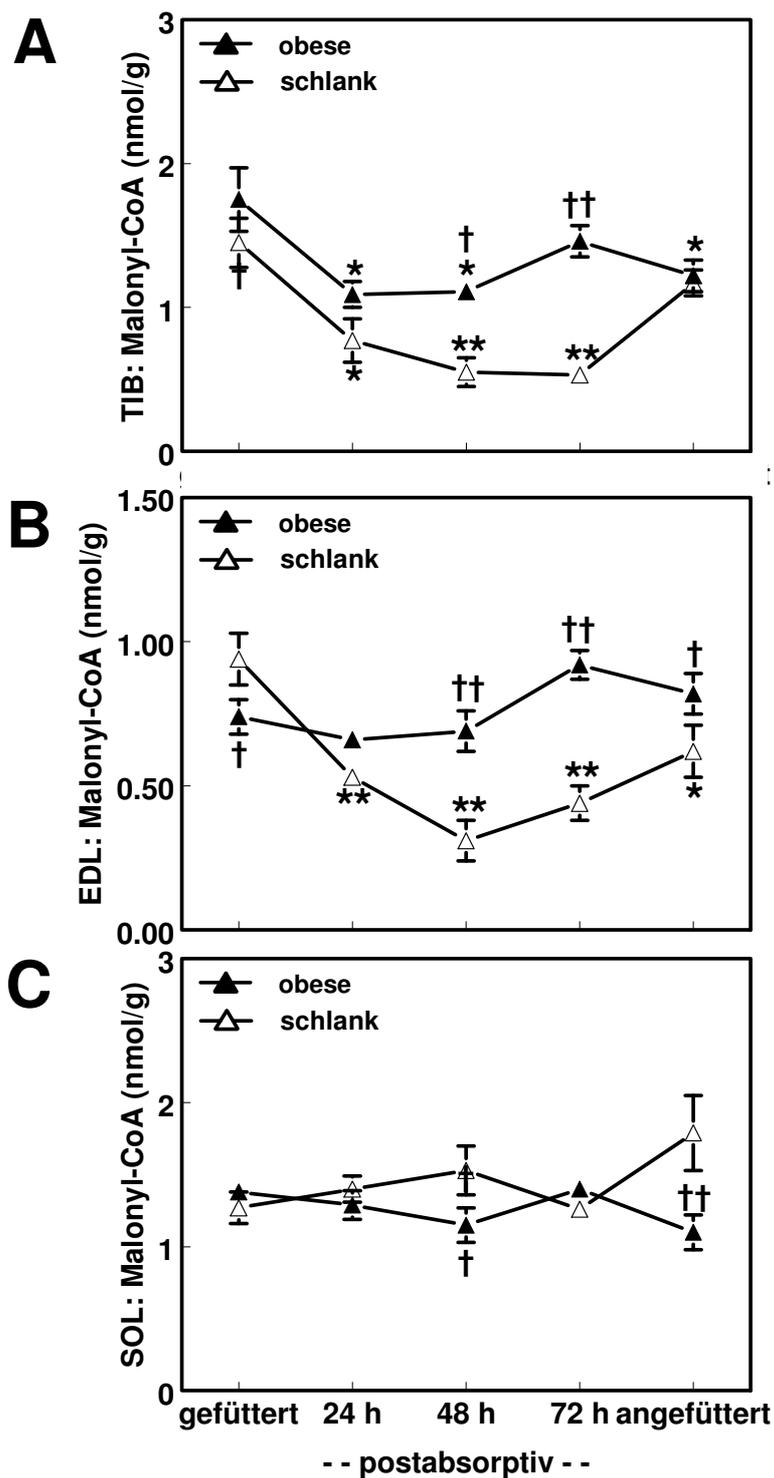


Abb. III.2.4.b-1 Verlauf von Malonyl-CoA 8 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere

(Werte sind Mittelwerte \pm SEM;

* $p < 0,05$ vs. gefüttert; ** $p < 0,001$ vs. gefüttert; † $p < 0,05$ vs. schlank;

†† $p < 0,001$ vs. schlank; interindividuelle Studie; $n=8$).

A: TIB (M. Tibialis Anterior)

B: EDL (M. Extensor Digitorum Longus)

C: SOL (M. Soleus)

In der Leber konnte bei den schlanken Tieren eine deutliche Dynamik beobachtet werden. Die Malonyl-CoA-Konzentration sank postabsorptiv auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze ab und stieg bei Wiederaanfütterung gegenüber dem Ausgangswert deutlich an.

Bei den obesen Tieren konnte über den gesamten Versuchszeitraum hinweg keine Änderung der Malonyl-CoA-Konzentration festgestellt werden.

Die Konzentration an Malonyl-CoA lag bis zum 4. Versuchstag bei den obesen Tieren signifikant höher als bei den schlanken Ratten. Nach 24-stündiger Wiederaanfütterung lagen die Werte der schlanken Tiere signifikant höher als die der obesen Ratten (Abb. III.2.4.b-2).

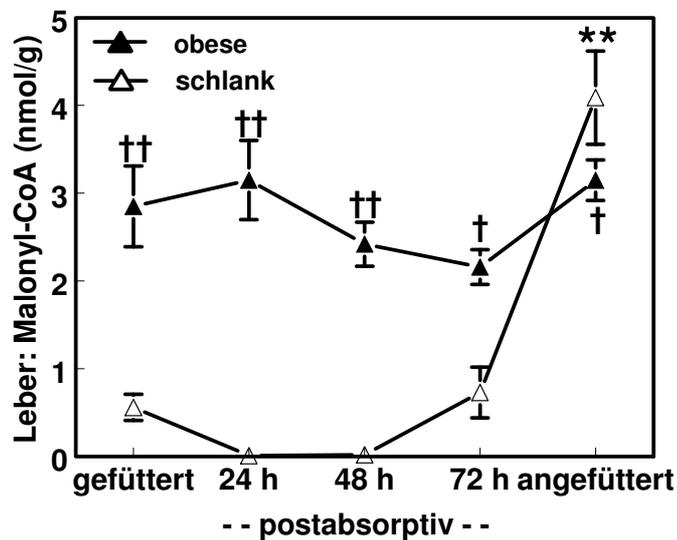


Abb. III.2.4.b-2 Verlauf von Malonyl-CoA in der Leber 8 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederaanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,001$ vs. gefüttert; † $p < 0,05$ vs. schlank; †† $p < 0,001$ vs. schlank; interindividuelle Studie; $n=8$).

III.2.4.c LCACoA-Gehalt in Skelettmuskulatur und Leber

Die Summe aller im LONG gemessenen langkettigen aktivierten Fettsäurespezies stieg bei den obesen Tieren postabsorptiv signifikant an. Alle untersuchten Fettsäurespezies zeigten während dieses Versuches die gleiche Dynamik. Die schlanken Tiere zeigten lediglich am ersten Tag der Nahrungskarenz einen Anstieg der LCACoA-Konzentration. Im weiteren Verlauf der postabsorptiven Periode sanken die LCACoA sodann deutlich ab.

Die langkettigen aktivierten Fettsäuren wurden bei beiden Gruppen dominiert von Palmitoyl-CoA (C16:0), Oleoyl-CoA (C18:1) sowie der Summe aus Linoleoyl-CoA (C18:2) und Arachidonoyl-CoA (C20:4). Palmitoleoyl-CoA (C16:1) war nur in geringen Mengen vorhanden, wobei der Anteil dieser aktivierten Fettsäure bei den obesen Tieren gegenüber den schlanken Kontrolltieren deutlich erhöht war. Gegenüber den schlanken Tieren waren Palmitoyl-CoA und Oleoyl-CoA ebenfalls erhöht. Die Konzentration von Linoleoyl-CoA und Arachidonoyl-CoA hingegen lag bei beiden Gruppen in ähnlichen Konzentrationsbereichen (Tab. III.2.4.c-1).

LCACoA-Spezies		Dauer der postabsorptiven Phase nmol/g Trockengewicht				
		gefüttert	24h	48h	72h	angefüttert
C16:0	schlank	5,9±0,2	6,7±0,4	5,4±0,3	2,7±0,3 **	4,3±0,3 *
	obese	7,7±0,6	10,5±1,3 ††	12,9±0,7 *††	11,9±1,2 *††	11,5±0,9 *††
C16:1	schlank	1,2±0,1	1,5±0,1	0,8±0,1	0,3±0,0 **	0,9±0,2
	obese	6,6±0,6 ††	7,2±1,0 ††	9,9±1,0 ††	9,3±1,3 ††	8,8±1,1 ††
C18:1	schlank	7,8±0,3	11,6±0,7 **	9,5±0,6	4,2±0,6 **	5,8±0,4
	obese	18,9±1,0 ††	22,6±1,8 ††	28,1±1,6 **††	27,2±1,9 *††	23,2±1,2 ††
C18:2 + C20:4	schlank	5,9±0,4	7,3±0,4	5,6±0,4	4,0±0,3 *	5,4±0,4
	obese	5,4±0,6	5,1±0,7 †	6,5±0,5	7,1±0,8 ††	6,6±0,5
Gesamt	schlank	21,0±0,8	27,2±1,5 *	21,2±1,4	11,8±1,2 **	17,0±1,1
	obese	38,4±2,3 ††	45,4±4,6 ††	57,3±3,4 *††	55,4±4,7 *††	50,2±2,9 ††

Tab. III.2.4.c-1 Verlauf der LCACoA im M. Longissimus Dorsi 8 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte ± SEM; *p<0,05 vs. gefüttert; **p<0,001 vs. gefüttert; † p<0,05 vs. schlank; †† p<0,001 vs. schlank; interindividuelle Studie; n=8); n.b. nicht bestimmt.

In der Leber unterschieden sich im gefütterten Zustand die beiden Tiergruppen hinsichtlich der Gesamtkonzentration aktivierter Fettsäuren nicht.

Konzentrationen über 30 nmol/g Trockenmasse erreichten bei den schlanken Kontrolltieren Linoleoyl-CoA, Oleoyl-CoA, Arachidonoyl-CoA sowie Palmitoyl-CoA. In geringeren Mengen konnten Stearoyl-CoA (C18:0) sowie Palmitoleoyl-CoA detektiert werden.

Bei den obesen Tieren waren Oleoyl-CoA, Palmitoyl-CoA sowie Palmitoleoyl-CoA in Konzentrationen über 30 nmol/g Trockenmasse nachzuweisen. Arachidonoyl-CoA und Linoleoyl-CoA waren mit ca. 20 nmol/g Trockenmasse gegenüber den schlanken Tieren in deutlich geringerer Konzentration vorhanden. Die Konzentration von Stearoyl-CoA lag im selben Bereich wie bei der Kontrollgruppe.

Postabsorptiv war bei beiden Gruppen ein deutlicher Anstieg der LCACoA-Gesamtkonzentration zu messen. Dabei fiel auf, dass die Konzentration bei den schlanken Tieren am dritten Tag der postabsorptiven Periode bereits wieder sank. Bei den obesen Ratten war dieses Absinken erst mit Wiederanfütterung zu beobachten.

Mit Ausnahme von Palmitoleoyl-CoA stieg postabsorptiv bei beiden Tiergruppen die Konzentration aller gemessenen aktivierten Fettsäuren an. Bei Palmitoleoyl-CoA konnte während der dreitägigen postabsorptiven Phase ein Absinken der Konzentration sowie ein hochsignifikanter Anstieg bei Wiederanfütterung beobachtet werden (Tab. III.2.4.c-2).

LCACoA-Spezies		Dauer der postabsorptiven Phase nmol/g Trockengewicht				
		gefüttert	24h	48h	72h	angefüttert
C16:0	schlank	36,5±1,5	53,1±3,6 *	50,2±3,9 *	37,9±3,2	36,8±1,9
	obese	45,9±5,7	52,7±4,6	57,5±8,0	52,6±5,4 †	33,2±3,8
C16:1	schlank	8,8±0,8	9,6±1,1	5,7±0,7	2,7±0,4	39,1±6,2 **
	obese	36,5±2,9 ††	27,2±1,9 *††	19,6±2,0 **††	16,1±1,2 **††	36,9±2,8
C18:0	schlank	9,6±0,6	35,4±2,9 **	29,4±1,8 **	21,1±2,2 **	7,3±0,5
	obese	9,5±0,4	22,9±1,2 **††	26,9±1,5 **	24,2±1,2 **	9,1±0,3
C18:1	schlank	55,9±2,0	67,0±3,9	66,2±5,7	41,5±4,2	65,6±3,8
	obese	57,1±5,9	78,4±5,1 *	69,6±7,2	67,5±4,1 ††	47,6±3,0 †
C18:2	schlank	79,3±6,0	110,9±4,7 *	109,8±7,6 *	59,2±5,3	45,3±4,6 **
	obese	19,1±3,4 ††	53,2±7,0 **††	62,8±7,2 **††	59,3±5,4 **	20,7±2,6 †
C20:4	schlank	37,9±1,8	87,1±2,5 **	74,0±2,3 **	62,2±3,9 **	33,4±2,4
	obese	20,3±0,9 ††	46,9±1,8 **††	47,3±3,0 **††	44,1±2,1 **††	23,8±1,3 †
Gesamt	schlank	228,0±6,3	363,1±16,7 **	335,3±20,2 **	224,6±17,0	227,5±13,1
	obese	188,4±17,4	281,3±17,9 *†	283,5±25,8 *†	263,7±16,9 *	171,2±12,2 †

Tab. III.2.4.c-2 Verlauf der LCACoA in der Leber 8 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte ± SEM; *p<0,05 vs. gefüttert; **p<0,001 vs. gefüttert; † p<0,05 vs. schlank; †† p<0,001 vs. schlank; interindividuelle Studie; n=8).

III.3 Postabsorptionsstudie bei 16 Wochen alten ZDF-Ratten

III.3.1 Physiologische Parameter

Das Körpergewicht nahm sowohl bei den schlanken als auch bei den obesen Ratten in der postabsorptiven Periode ab. Nach Wiederanfütterung stieg das Körpergewicht in beiden Gruppen gegenüber dem letzten Tag wieder an. Die obesen Ratten hatten im gefütterten Zustand sowie nach Wiederanfütterung ein höheres Körpergewicht als ihre schlanken Geschwistertiere. Das Körpergewicht der Satellitengruppen unterschied sich nicht von dem der NMR-Gruppen (Abb. III.3.1-1).

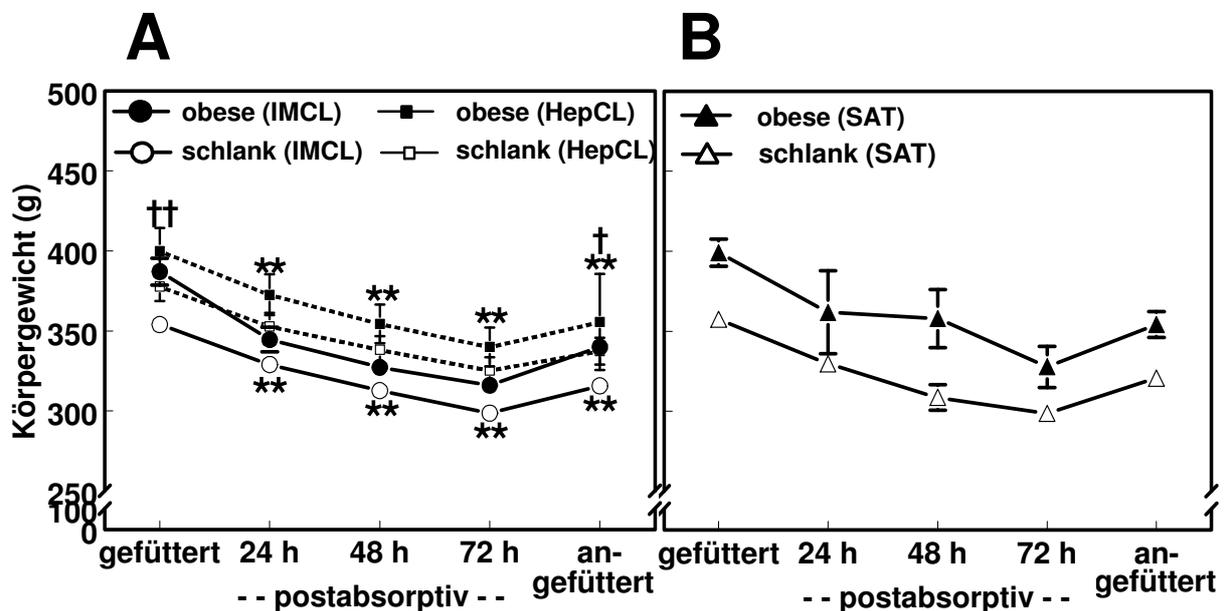


Abb. III.3.1-1 Verlauf des Körpergewichtes 16 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

- A: NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=6-8):
 Für IMCL-Gruppen gilt; ** p<0,001 vs. gefüttert;
 † p<0,05 vs. schlank; †† p<0,001 vs. schlank
- B: Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)

III.3.2 Stoffwechselfparameter im Serum

Der Blutglukosespiegel sank postabsorptiv bei beiden Gruppen signifikant ab. Bei Anfütterung stieg die Blutglukose wieder an.

Die obesen Tiere wiesen im gefütterten Zustand mit 25 mmol / l einen deutlich im diabetischen Bereich liegenden Blutglukosespiegel auf. Auch während der postabsorptiven Phase sanken die Glukosewerte nicht in den normoglykämischen Bereich ab. Sie lagen im gesamten Versuchszeitraum höher als bei den schlanken Kontrollen.

Die Unterschiede zwischen NMR- und Satellitengruppe waren hinsichtlich ihrer biologischen Aussage von untergeordneter Bedeutung (Abb. III.3.2-1).

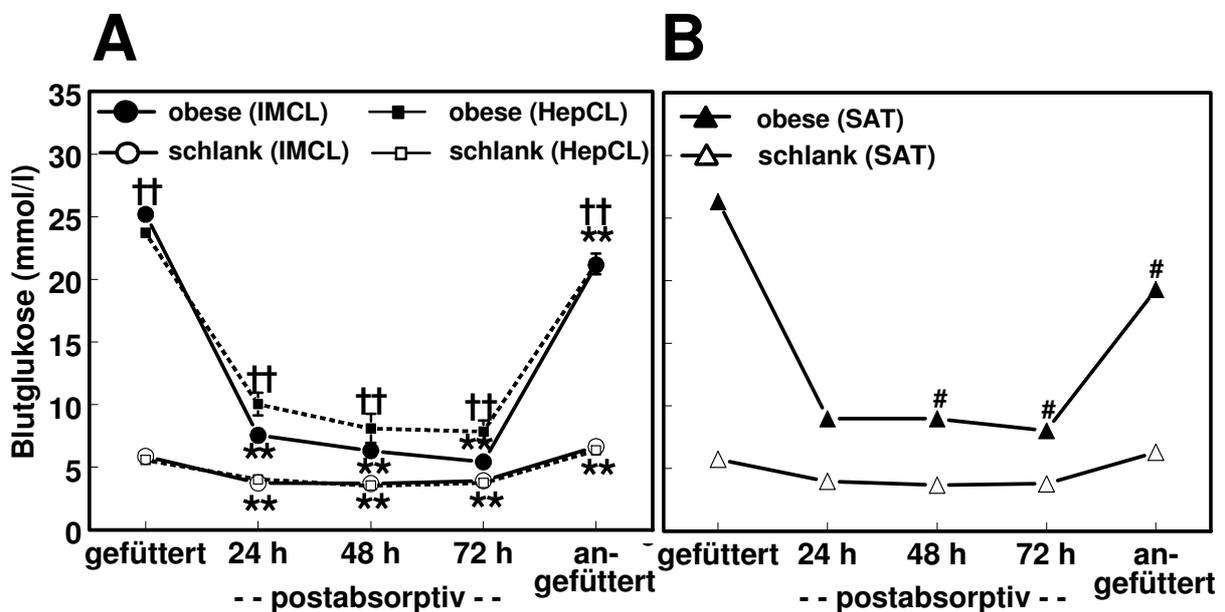


Abb. III.3.2-1 Verlauf der Blutglukosespiegel 16 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

- A: NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=6-8):
Für IMCL-Gruppen gilt: ** p < 0,001 vs. gefütterter; †† p < 0,001 vs. schlank
- B: Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)
p < 0,05 vs. IMCL-Gruppen

Die Insulinspiegel der obesen Tiere lagen über den gesamten Versuchszeitraum hinweg signifikant höher als bei den schlanken Ratten. Die erhöhte Insulinkonzentration ist Ausdruck der Insulinresistenz bei den obesen Tieren. Beide Tiergruppen glichen sich jedoch hinsichtlich der Verlaufskurve. Die Serumkonzentrationen sanken postabsorptiv ab, um bei Wiederaanfütterung auf das Ausgangsniveau anzusteigen.

Die Satellitengruppen verhielten sich weitgehend analog zu den Tieren der NMR-Gruppen (Abb. III.3.2-2).

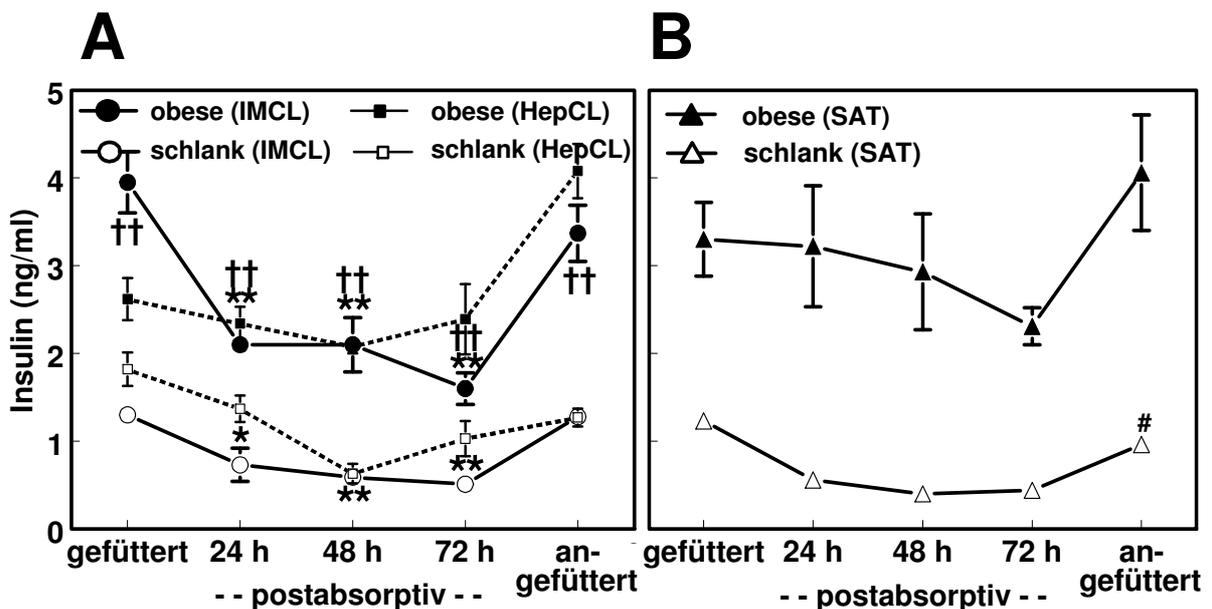


Abb. III.3.2-2 Verlauf der Insulinspiegel 16 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederaanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

- A:** NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=6-8):
Für IMCL-Gruppen gilt: * p<0,05 vs. gefüttert; ** p<0,001 vs. gefüttert;
†† p<0,001 vs. schlank
- B:** Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)
p<0,05 vs. IMCL-Gruppen

Die Triglyzeridspiegel der obesen Ratten lagen während des gesamten Versuchszeitraums auf einem, gegenüber den schlanken Tieren deutlich erhöhten Niveau.

Die Serumtriglyzeridspiegel sanken während der Nahrungskarenz bei beiden untersuchten Gruppen deutlich ab. Bei den obesen Tieren waren die Werte jedoch erst am dritten Tag der postabsorptiven Periode signifikant gegenüber dem gefütterten Zustand erniedrigt. Mit Wiederaanfütterung am 5. Versuchstag stiegen die

Triglyzeridspiegel wieder an, erreichten bei den obesen Tieren jedoch nicht das Niveau des ersten Versuchstages. Bei den schlanken Kontrolltieren sanken die Triglyzeride über die gesamte Dauer des Nahrungsentzuges hin ab. Am 5. Versuchstag war bei dieser Gruppe ein deutlicher Anstieg zu erkennen. Die Triglyzeridspiegel der schlanken Ratten lagen nach Anfütterung höher als am ersten Versuchstag.

Die Serumtriglyzeridspiegel in den Satellitengruppen zeigten grundsätzlich den gleichen Verlauf wie in den NMR-Gruppen. Allerdings lagen die Werte bei den schlanken Ratten der Satellitengruppe signifikant höher als die der NMR-Gruppe. Bei den obesen Tieren zeigten sich zu Beginn der postabsorptiven Phase in der NMR-Gruppe höhere Triglyzeridspiegel (Abb. III.3.2-3).

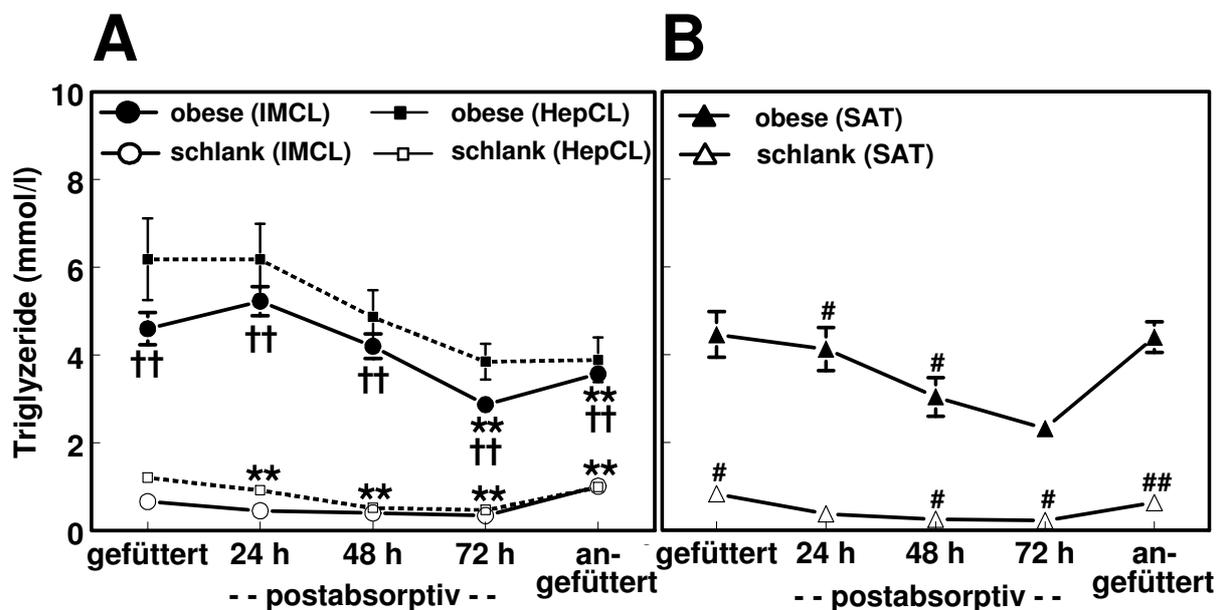


Abb. III.3.2-3 Verlauf der Triglyzeridspiegel 16 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

- A:** NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=6-8):
 Für IMCL-Gruppen gilt: ** p<0,001 vs. gefüttert; †† p<0,001 vs. schlank
- B:** Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)
 # p<0,05 vs. IMCL-Gruppen; ## p<0,001 vs. IMCL-Gruppen

Bei den FFS kam es postabsorptiv in beiden Tiergruppen zu einem Anstieg der Serumkonzentration. Dieser Anstieg war bei den obesen Tieren nicht so deutlich ausgeprägt. Die FFS der obesen Tiere lagen im gefütterten Zustand der Tiere bereits auf einem höheren Niveau als innerhalb der Kontrollgruppe. Während der postabsorptiven Phase lagen die Werte der obesen Tiere niedriger als die der schlanken Kontrollgruppe.

In beiden Gruppen dieser Studie kam es zu einem Absinken der FFS bei Wiederaanfütterung der Tiere am 5. Versuchstag.

Zwischen NMR- und Satellitengruppen traten nur bei Einzelwerten Unterschiede auf (Abb. III.3.2-4).

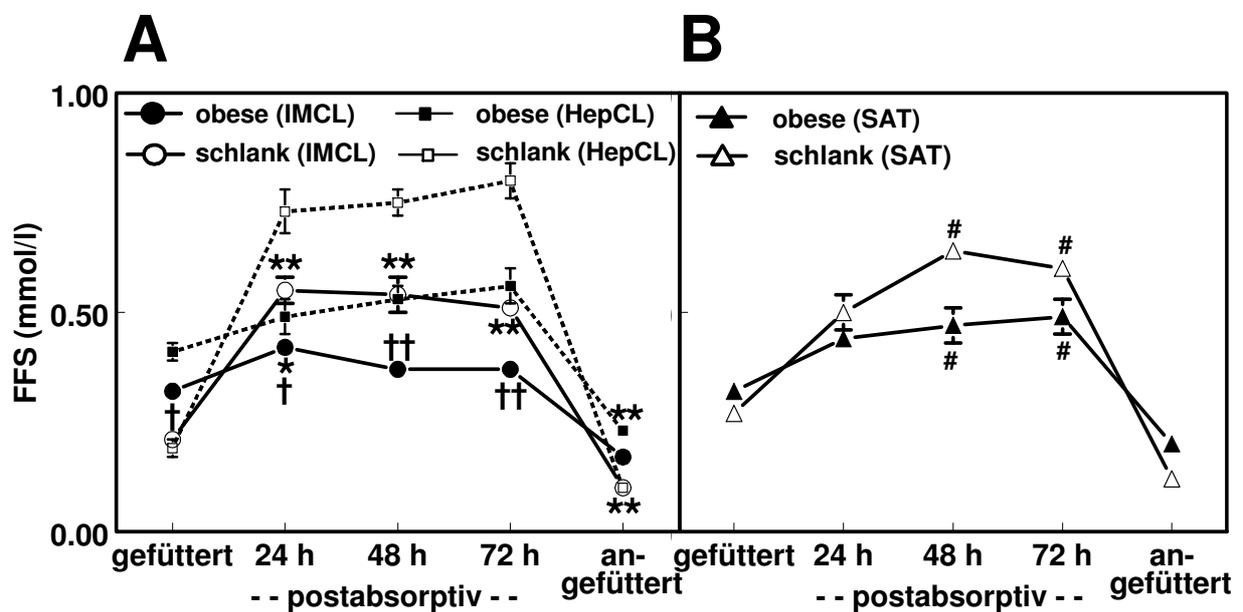


Abb. III.3.2-4 Verlauf der FFS 16 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederaanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

A: NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=6-8):

Für IMCL-Gruppen gilt: * $p < 0,05$ vs. gefüttert; ** $p < 0,001$ vs. gefüttert;

† $p < 0,05$ vs. schlank; †† $p < 0,001$ vs. schlank

B: Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag)

$p < 0,05$ vs. IMCL-Gruppen

Die Ketonkörper stiegen postabsorptiv sowohl bei den obesen, als auch bei den schlanken Ratten an. Der höchste Werte wurde hierbei erst nach 72-stündiger Dauer der postabsorptiven Periode erreicht. Die schlanken Tiere erreichten in der postabsorptiven Phase deutlich höhere Werte als die obesen Ratten.

NMR- und Satellitengruppe glichen sich im Verlauf der Ketonkörperspiegel (Abb. III.3.2-5).

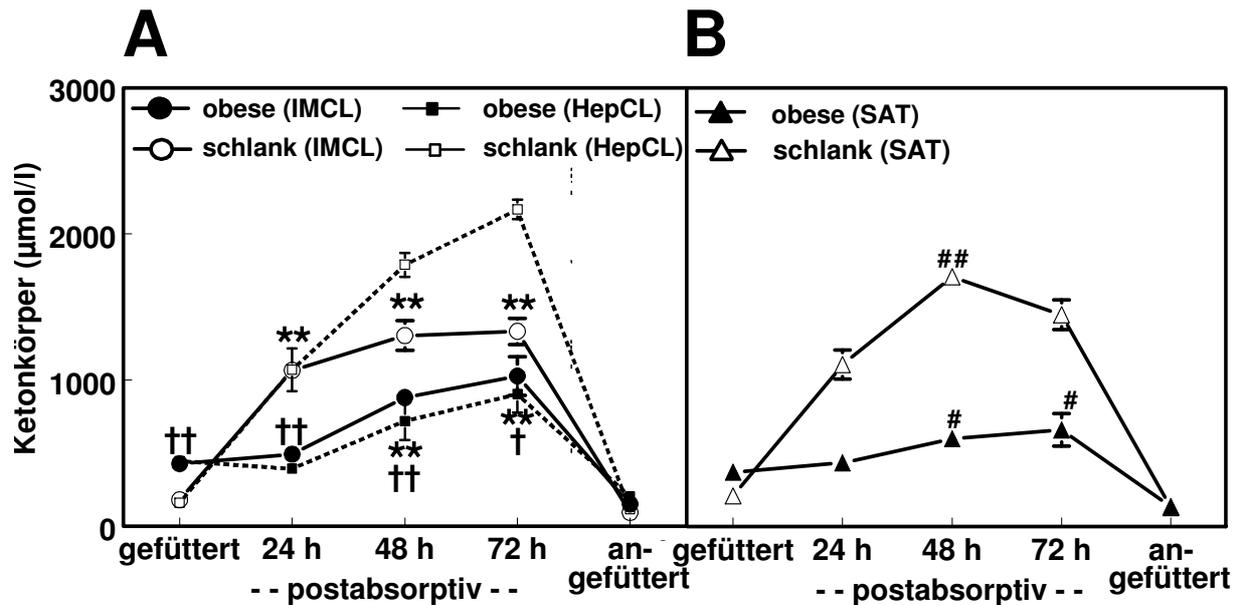


Abb. III.3.2-5 Verlauf der Ketonkörperspiegel 16 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM).

- A:** NMR-Gruppen, intraindividuelle Studie (n=6-8):
Für IMCL-Gruppen gilt: ** p<0,001 vs. gefüttert; † p<0,05 vs. schlank;
†† p<0,001 vs. schlank
- B:** Satellitengruppen, interindividuelle Studie (n=8 pro Versuchstag);
p<0,05 vs. IMCL-Gruppen; ## p<0,001 vs. IMCL-Gruppen

III.3.3 ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen („NMR-Gruppen“)

III.3.3.a IMCL-Gehalt verschiedener Skelettmuskeltypen

Der IMCL-Gehalt der obesen Tiere lag in allen untersuchten Skelettmuskeltypen deutlich höher als derjenige der schlanken Ratten.

Im TIB zeigte sich postabsorptiv eine deutliche Zunahme des IMCL-Gehaltes. Diese Dynamik war bei den schlanken Tieren prozentual deutlich höher als bei den obesen Ratten. Die absoluten Werte waren bei den schlanken Tieren jedoch deutlich niedriger als bei der obesen Gruppe. Nach 24-stündiger Wiederaanfütterung lag der IMCL-Spiegel bei beiden Gruppen auf Ausgangsniveau.

Die gleichen Veränderungen zeigten sich im EDL bei beiden untersuchten Genotypen.

Im SOL stieg der IMCL-Gehalt bei den schlanken Kontrolltieren postabsorptiv ebenfalls signifikant an. Der Anstieg war im SOL jedoch nicht so deutlich ausgeprägt wie in den anderen Muskelfasertypen. Die obesen Ratten zeigten im SOL keine signifikanten Veränderungen im Rahmen dieses Versuches (Abb. III.3.3.a-1).

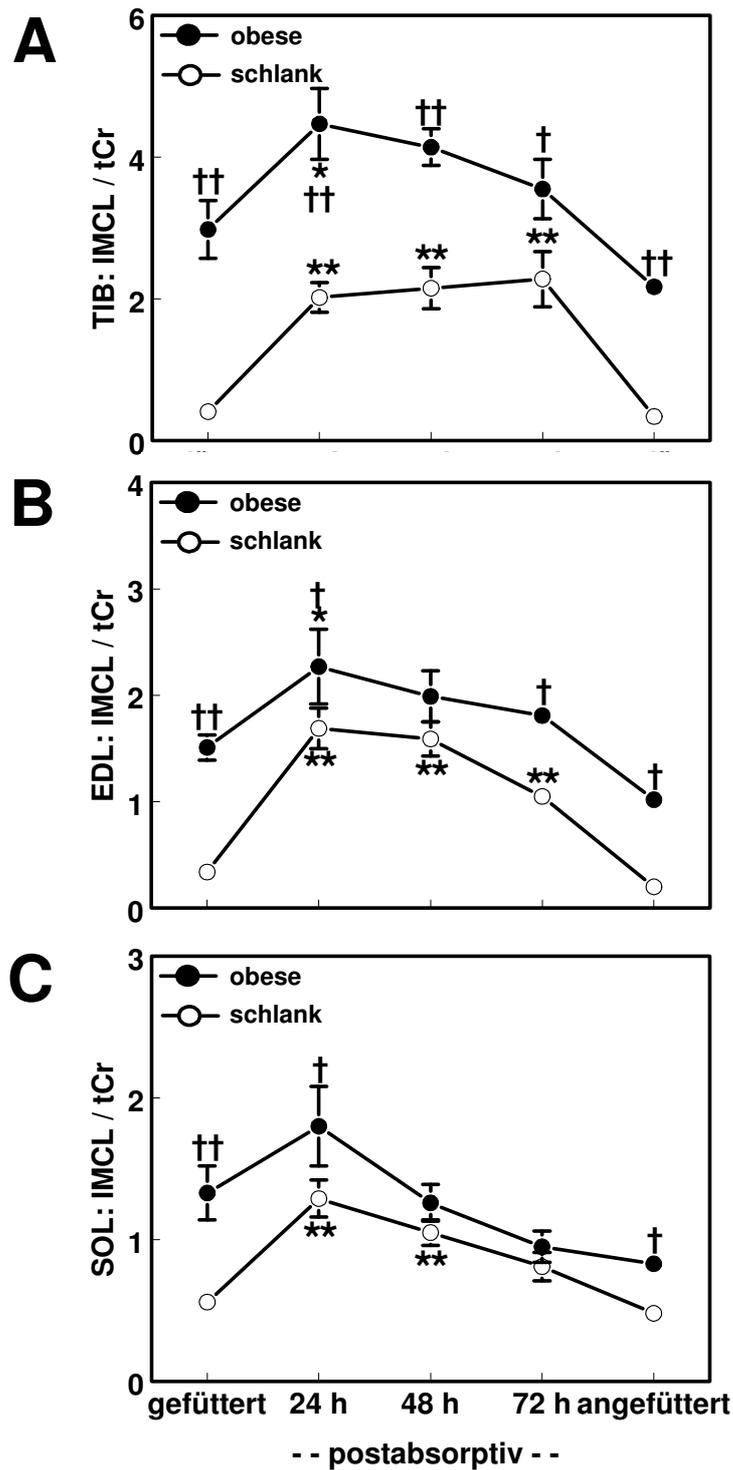


Abb. III.3.3.a-1 Verlauf des IMCL-Gehaltes 16 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. gefüttert; ** $p < 0,001$ vs. gefüttert; † $p < 0,05$ vs. schlank; †† $p < 0,001$ vs. schlank; intraindividuelle Studie; $n = 6-8$).

- A: TIB (M. Tibialis Anterior)
- B: EDL (M. Extensor Digitorum Longus)
- C: SOL (M. Soleus)

III.3.3.b Hepatozellulärer Lipidgehalt

Der HepCL-Gehalt der obesen Tiere lag über den gesamten Versuchszeitraum hinweg deutlich höher als derjenige der Kontrollgruppe.

Das HepCL sank bei den obesen Ratten postabsorptiv ab. Bei den schlanken Tieren war über den gesamten Versuchszeitraum hinweg keine signifikante Änderung von HepCL zu erkennen (Abb. III.3.3.b-1).

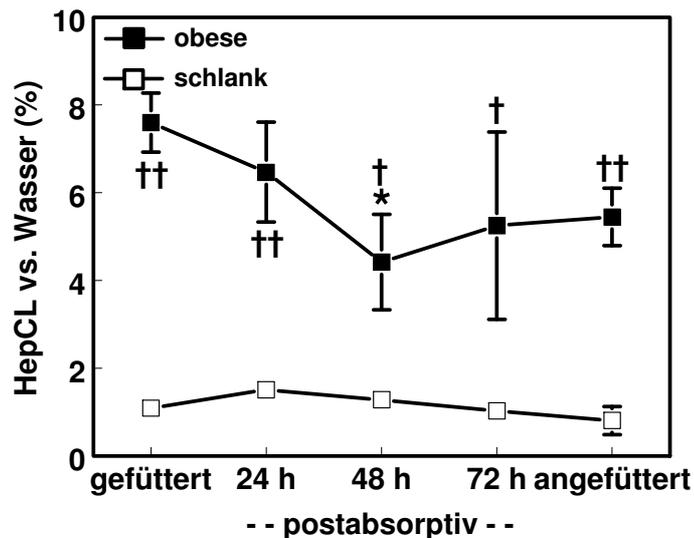


Abb. III.3.3.b-1 Verlauf des HepCL-Gehaltes 16 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. gefüttert; † $p < 0,05$ vs. schlank; †† $p < 0,001$ vs. schlank; intraindividuelle Studie; $n = 6-8$).

III.3.4 Bestimmung biochemischer Parameter in Skelettmuskulatur und Leber („Satellitengruppen“)

III.3.4.a Kreatingehalt verschiedener Skelettmuskeltypen

Der tCr-Gehalt der untersuchten Skelettmuskeltypen blieb während der postabsorptiven Phase annähernd konstant. Lediglich im TIB der schlanken Ratten kam es zu einer Erhöhung des tCr-Gehaltes. Diese Erhöhung blieb jedoch bei Wiederanfütterung bestehen. Im TIB lagen die tCr-Konzentrationen bei den obesen Tieren höher als die der schlanken Kontrollratten (Tab. III.3.4.a-1).

Signifikant höhere tCr-Konzentrationen lagen ausschließlich bei obesen Tieren oder während der postabsorptiven Phase vor. Zu beiden Messzeitpunkten lagen gleichzeitig erhöhte IMCL-Werte vor. Somit verändert sich die Grundaussage nicht.

tCr		Dauer der postabsorptiven Phase µmol/g Trockenmasse				
		gefüttert	24h	48h	72h	angefüttert
TIB	schlank	144,0±1,1			152,9±1,4 **	152,6±0,9 **
	obese	168,5±3,2 ††			165,9±2,8 ††	165,1±1,1 ††
EDL	schlank	130,7±0,9			133,5±0,6	130,3±2,5
	obese	134,7±3,0			137,9±2,8	138,2±2,6 †
SOL	schlank	91,8±1,0			86,6±2,3	87,5±1,3
	obese	87,3±1,7			84,8±1,8	83,7±1,7

Tab. III.3.4.a-1 Verlauf von Gesamt-Kreatin (tCr) im M. Tibialis Anterior (TIB), im M. Extensor Digitorum Longus (EDL) sowie im M. Soleus (SOL) 16 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte ± SEM; ** p<0,001 vs. gefüttert; † p<0,05 vs. schlank; †† p<0,001 vs. schlank; interindividuelle Studie; n=8).

III.3.4.b Malonyl-CoA in Skelettmuskulatur und Leber

Der Malonyl-CoA-Gehalt der schlanken Tiere sank sowohl im TIB als auch im EDL postabsorptiv ab. Bei den obesen Ratten blieb die Konzentration in beiden Muskeln während der Dauer des Versuches konstant. In gefüttertem Zustand lag der Malonyl-CoA-Gehalt bei den obesen Tieren in beiden Muskeln signifikant niedriger als bei den schlanken Kontrollen.

Im SOL traten postabsorptiv bei beiden untersuchten Gruppen keine Änderungen der Malonyl-CoA-Konzentration auf. Die Konzentration der schlanken Tiere entsprach derjenigen der obesen Ratten (Abb. III.3.4.b-1).

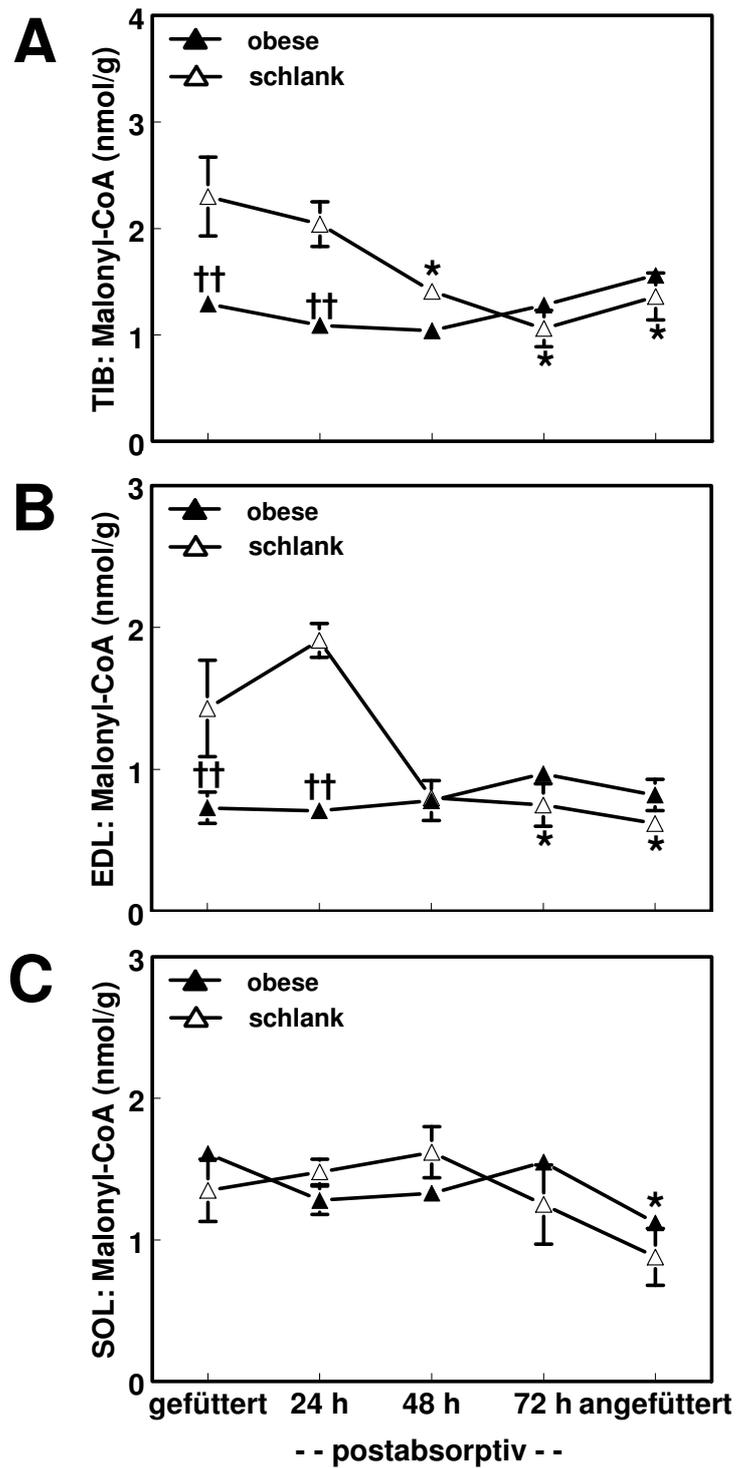


Abb. III.3.4.b-1 Verlauf von Malonyl-CoA 16 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. gefüttert; $\dagger\dagger$ $p < 0,001$ vs. schlank; interindividuelle Studie; $n=8$).
 A: TIB (M. Tibialis Anterior)
 B: EDL (M. Extensor Digitorum Longus)
 C: SOL (M. Soleus)

In der Leber kam es bei beiden untersuchten Gruppen erst mit Wiederanfütterung zu Konzentrationsänderungen: Hier war eine deutliche Erhöhung des Malonyl-CoA-Gehaltes zu messen.

Während der ersten 3 Versuchstage lagen die Malonyl-CoA-Werte der obesen Tiere signifikant höher als diejenigen der schlanken Ratten (Abb. III.3.4.b-2).

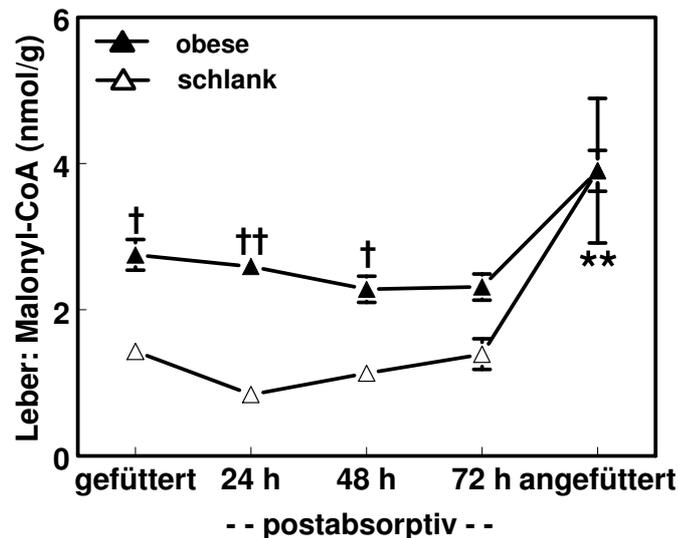


Abb. III.3.4.b-2 Verlauf von Malonyl-CoA in der Leber 16 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; ** $p < 0,001$ vs. gefüttert; † $p < 0,05$ vs. schlank; †† $p < 0,001$ vs. schlank; interindividuelle Studie; $n=8$).

III.3.4.c LCACoA in Skelettmuskulatur und Leber

Die Summe der LCACoA's im LONG blieb während der gesamten Versuchsdauer bei den schlanken Tieren konstant. Die obesen Ratten zeigten dagegen eine geringe Erhöhung der LCACoA-Konzentration während der ersten beiden Tage der postabsorptiven Phase sowie eine signifikante Erhöhung nach Wiederanfütterung.

Auch die einzelnen gemessenen Fettsäuren zeigten während des Versuches nur eine geringe Dynamik. Lediglich bei Einzelwerten ergaben sich signifikante Konzentrationserhöhungen.

Sowohl die Summe der LCACoA's als auch jede einzelne aktivierte Fettsäure lag bei den obesen Ratten im gefütterten Zustand in signifikant höherem Konzentrationsbereich als bei den schlanken Tieren.

Die quantitativ dominierenden aktivierten Fettsäuren stellten bei beiden Gruppen Oleoyl-CoA (C18:1) sowie die Summe aus Linoleoyl-CoA (C18:2) und Arachidonoyl-CoA (C20:4) dar. In nur geringen Mengen war bei beiden untersuchten Gruppen Palmitoleoyl-CoA (C16:1) zu finden (Tab. III.3.4.c-1).

LCACoA-Spezies		Dauer der postabsorptiven Phase				
		gefüttert	24h	48h	72h	angefüttert
C16:0	schlank	3,1±0,3	3,0±0,2	3,7±0,2	3,7±0,2	4,0±0,2 *
	obese	4,7±0,3 †	6,4±0,8 ††	6,8±0,8 ††	5,0±0,6	7,7±0,9 *††
C16:1	schlank	1,1±0,2	1,4±0,2	1,0±0,1	1,3±0,1	0,8±0,1
	obese	2,6±0,2 †	4,0±0,8 ††	4,3±0,5 ††	3,1±0,5 †	5,1±0,4 *††
C18:1	schlank	7,0±0,7	8,2±0,5	8,4±0,2	9,9±0,5 **	8,3±0,5
	obese	9,6±0,6 †	13,6±1,0 *††	13,9±1,3 *††	10,2±0,9	15,3±0,7 **††
C18:2 + C20:4	schlank	5,6±0,4	5,1±0,3	5,5±0,2	5,4±0,2	7,2±0,3 *
	obese	7,0±0,5 †	6,2±0,5	5,7±0,4	5,3±0,5	8,7±0,8 †
Gesamt	schlank	17,0±1,3	17,8±1,0	18,6±0,5	20,4±0,6	20,4±1,0
	obese	23,8±1,6 †	30,2±2,5 ††	30,7±2,6 ††	23,6±2,2	36,8±2,3 **††

Tab. III.3.4.c-1 Verlauf der LCACoA im M. Longissimus Dorsi 16 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte ± SEM; *p<0,05 vs. gefüttert; **p<0,001 vs. gefüttert; † p<0,05 vs. schlank; †† p<0,001 vs. schlank; interindividuelle Studie; n=8).

In der Leber erhöhte sich die Gesamtkonzentration der LCACoA's bei den schlanken Tieren an den ersten beiden Tagen der postabsorptiven Phase signifikant. Bei den obesen Ratten traten über den gesamten Versuchszeitraum hinweg keine Konzentrationsänderungen in der Summe der gemessenen aktivierten Fettsäuren auf.

Die einzelnen Fettsäuren zeigten teilweise eine ausgeprägte Dynamik. Die Konzentration von C16:1 stieg bei den obesen Tieren bei Anfütterung auf das 4-fache des Ausgangswertes an. In der postabsorptiven Phase waren keine Veränderungen zu erkennen. Die C18:2-Konzentration war bei den obesen Tieren bei Wiederanfütterung signifikant erniedrigt, nachdem sich während der postabsorptiven Phase keine Konzentrationsänderungen ergeben hatten. C18:0 stieg bei den schlanken Tieren während der postabsorptiven Phase deutlich an und sank bei Wiederanfütterung wieder auf Ausgangsniveau ab. Eine Konzentrationserhöhung von C20:4 war bei den schlanken Ratten zu messen. Nach Anfütterung lagen die Werte wieder auf Ausgangsniveau.

Die Konzentration der Summe der LCACoA's war bei den obesen Ratten während der postabsorptiven Phase niedriger als bei den schlanken Tieren. Diese Konzentrationsunterschiede waren auch bei C18:0, C18:2 und C20:4 zu sehen. Dagegen lag die Konzentration von C16:1 bei den obesen Ratten höher als bei den schlanken Kontrollen.

Die höchsten Konzentrationen waren bei beiden Tiergruppen bei C18:2 zu messen. In nur geringen Mengen konnten C18:0 sowie C16:1 nachgewiesen werden (Tab. III.3.4.c-2).

LCACoA-Spezies		Dauer der postabsorptiven Phase				
		gefüttert	24h	48h	72h	angefüttert
C16:0	schlank	37,3±3,4	48,0±5,3	56,5±3,1 *	44,1±4,3	38,7±3,8
	obese	35,9±4,1	46,5±2,9	45,2±6,7	48,2±6,4	27,7±4,0
C16:1	schlank	8,1±0,5	6,3±0,8	6,9±0,5	4,9±0,6	10,9±1,6
	obese	9,6±1,3	14,4±3,2 †	11,3±3,1	9,5±1,8	46,0±5,8 **†
C18:0	schlank	11,7±3,7	39,3±2,0 **	35,0±4,0 **	32,3±2,5 **	13,1±1,0
	obese	9,7±0,5	14,7±0,8 *††	13,2±1,8 ††	12,0±1,3 ††	6,2±0,5 †
C18:1	schlank	52,3±2,7	56,9±5,8	63,2±3,0	52,5±5,6	51,4±3,5
	obese	38,2±3,4	64,0±4,0 *	57,8±7,6	58,9±6,6	47,9±5,7
C18:2	schlank	84,5±6,5	99,9±12,6	113,5±5,7	92,6±8,3	54,3±5,9
	obese	79,6±12,7	80,3±10,6	62,9±4,7 ††	72,2±7,6	27,1±3,0 **†
C20:4	schlank	34,2±5,7	73,2±2,9 **	64,9±5,4 **	70,4±3,6 **	37,1±2,2
	obese	32,5±1,7	43,5±2,6 *††	38,6±2,6 ††	36,2±2,0 ††	29,3±1,5
Gesamt	schlank	228,0±18,1	323,5±26,6 *	339,9±19,2 *	296,8±22,1	205,4±13,2
	obese	205,5±20,6	263,2±14,5 †	229,0±19,5 ††	236,9±22,0 †	184,3±18,2

Tab. III.3.4.c-2 Verlauf der LCACoA in der Leber 16 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte ± SEM; *p<0,05 vs. gefüttert; **p<0,001 vs. gefüttert; † p<0,05 vs. schlank; †† p<0,001 vs. schlank interindividuelle Studie).

III.4 Behandlung von obesen ZDF-Ratten mit Antidiabetika

III.4.1 Monitoring

III.4.1.a Futter- und Wasserverbrauch

Der Futterverbrauch stieg bei den obesen Kontrolltieren über den gesamten Versuchszeitraum hinweg kontinuierlich an.

Die mit Rosiglitazon behandelten Tieren verbrauchten während der gesamten Studiendauer signifikant mehr Futter als alle anderen untersuchten Gruppen.

Bei Behandlung mit Metformin oder dem PPAR- α -Agonisten (PPAR-Ag.) stieg der Futterverbrauch im Versuchsverlauf nur geringgradig an. Er lag bei beiden Gruppen ab dem Alter von 11 Wochen niedriger als bei den Kontrolltieren (Abb. III.4.1.a-1).

Berechnet auf das Tiergewicht konnte bei allen Gruppen ein Absinken des Futterverbrauches beobachtet werden. Berechnet auf 100 g Ratte war der Futterverbrauch der mit Rosiglitazon behandelten Tiere nur noch unwesentlich gegenüber den anderen Gruppen erhöht (Abb. III.4.1.a-1).

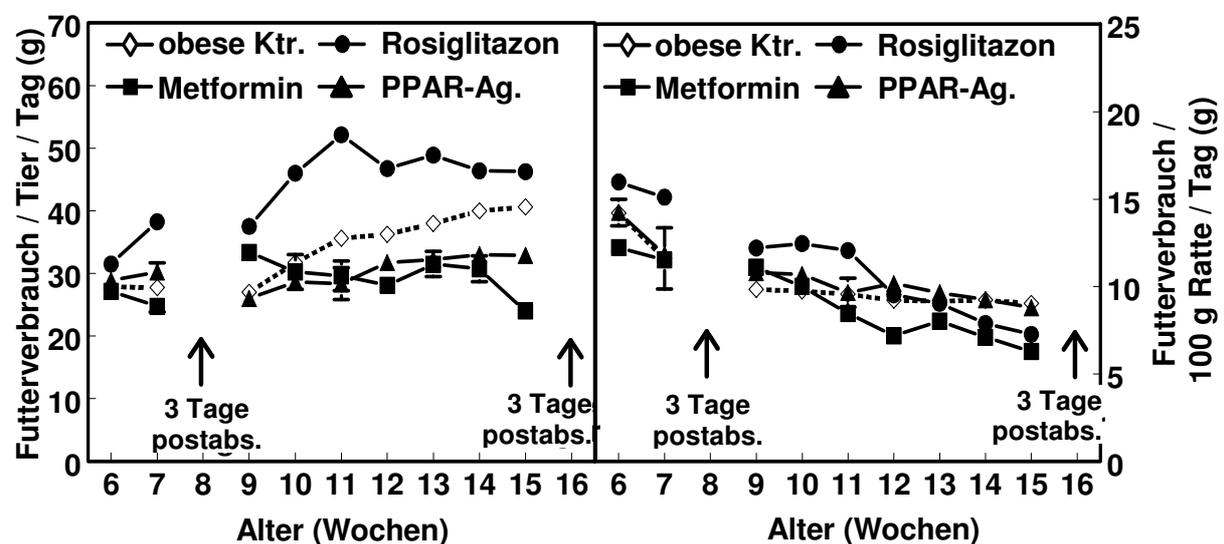


Abb. III.4.1.a-1 Futterverbrauch behandelter ZDF-Ratten sowie von obesen Kontrolltieren während des 11-wöchigen Versuchsprotokolls (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; (n=7-8 pro Gruppe); postabs.: postabsorptive Phase; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

Der Wasserverbrauch der Kontrolltiere stieg bis zum Versuchsende hin kontinuierlich an. Die Tiere zeigten ab der 11. Lebenswoche, einhergehend mit der Manifestation des Diabetes Mellitus, eine deutliche Polydipsie. Bei den behandelten

Gruppen blieb der Wasserverbrauch über den untersuchten Zeitraum hinweg konstant.

Der Wasserverbrauch der mit Rosiglitazon behandelten Tiere lag ab der 7. Lebenswoche höher als bei den anderen behandelten Versuchsgruppen (Abb. III.4.1.a-2).

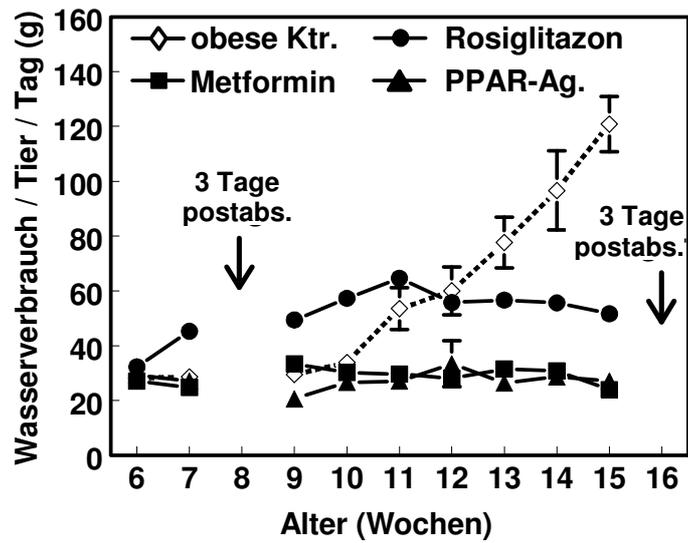


Abb. III.4.1.a-2 Wasserverbrauch behandelter ZDF-Ratten sowie von obesen Kontrolltieren während des 11-wöchigen Versuchsprotokolls (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; (n=7-8 pro Gruppe); postabs.: postabsorptive Phase; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

III.4.1.b Physiologische Parameter

Das Körpergewicht stieg bei allen Gruppen bis zum Versuchsende hin an. Während der postabsorptiven Phase in der 8. Lebenswoche trat eine Stagnation der Körpergewichtsentwicklung auf.

Das Körpergewicht der Metformin-Gruppe unterschied sich während der gesamten Versuchsdauer nicht von dem der Kontrollgruppe.

Die Rosiglitazon behandelten Tiere hatten ein höheres, die mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tiere ein niedrigeres Körpergewicht als die Kontrolltiere (Abb. III.4.1.b-1).

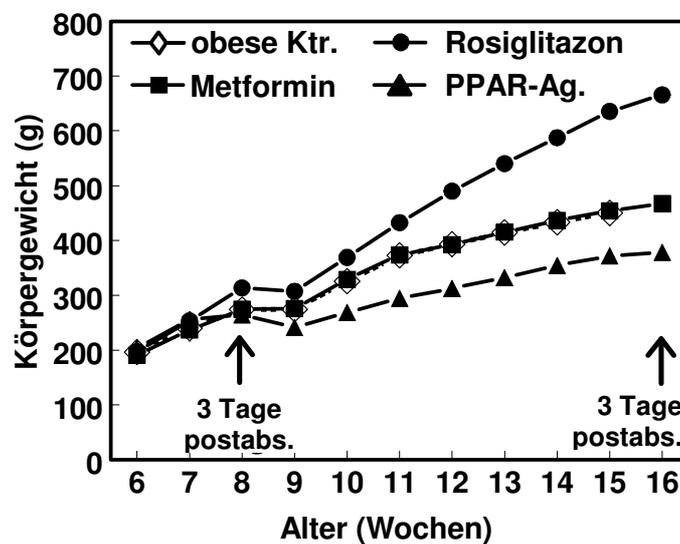


Abb. III.4.1.b-1 Körpergewichtsentwicklung behandelter ZDF-Ratten sowie von obesen Kontrolltieren während des 11-wöchigen Versuchsprotokolls (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; (n=7-8 pro Gruppe); postabs.: postabsorptive Phase; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

III.4.1.c Stoffwechselfparameter im Serum

Die Blutglukose der obesen Kontrollgruppe stieg ab der 11. Lebenswoche deutlich an. Bei den behandelten Gruppen blieb der Blutglukosespiegel über den gesamten Versuchszeitraum hinweg konstant (Abb. III.4.1.c-1).

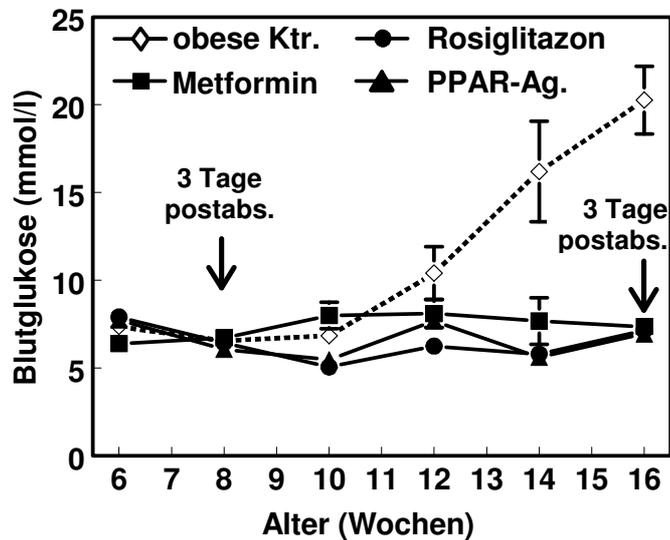


Abb. III.4.1.c-1 Verlauf der Blutglukose behandelter ZDF-Ratten sowie von obesen Kontrolltieren während des 11-wöchigen Versuchsprotokolls (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; (n=7-8 pro Gruppe); postabs.: postabsorptive Phase; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

Die HbA1c-Werte stiegen bei der unbehandelten Kontrollgruppe ab der 14. Lebenswoche deutlich an.

Bei allen behandelten Gruppen kam es nur gegen Versuchsende zu einer geringen Erhöhung des HbA1c-Wertes (Abb. III.4.1.c-2).

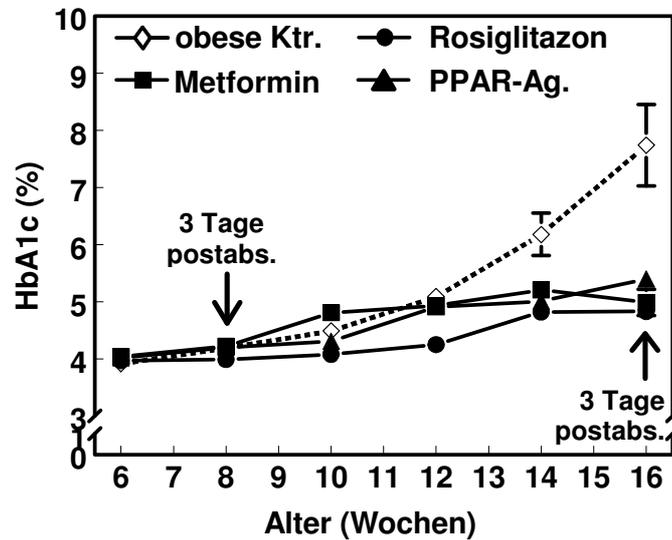


Abb. III.4.1.c-2 Verlauf von HbA1c behandelter ZDF-Ratten sowie von obesen Kontrolltieren während des 11-wöchigen Versuchsprotokolls (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; $n=7-8$ pro Gruppe); postabs.: postabsorptive Phase; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

Die Serumspiegel von Insulin stiegen bei der Kontrollgruppe bis zur 12. Lebenswoche hin an. Danach konnte ein Absinken der Serumkonzentration beobachtet werden. Einen ebensolchen Verlauf zeigte die mit Metformin behandelte Gruppe.

Die Insulinspiegel der mit Rosiglitazon sowie mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tiere sanken über den Versuchszeitraum ab, wobei der stärkste Abfall zu Beginn der Behandlung zu beobachten war.

Die niedrigste Insulinkonzentration im Serum wies die PPAR- α -Agonist-Gruppe auf (Abb. III.4.1.c-3).

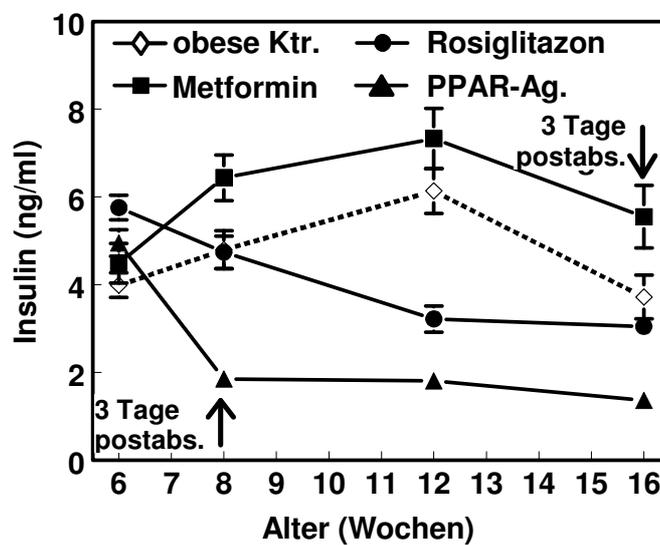


Abb. III.4.1.c-3 Verlauf der Insulinspiegel behandelter ZDF-Ratten sowie von obesen Kontrolltieren während des 11-wöchigen Versuchsprotokolls (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; (n=7-8 pro Gruppe); postabs.: postabsorptive Phase; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

Die Triglyzeridspiegel im Serum stiegen sowohl bei der Kontroll- als auch bei der Metformin-Gruppe ab der 8. Lebenswoche gegenüber den mit Rosiglitazon bzw. mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tieren an. Dabei stagnierte der Anstieg bei den Kontrolltieren ab der 12. Lebenswoche, während die Serumtriglyzeride der Metformin-Tiere weiter anstiegen.

Bei den mit Rosiglitazon bzw. dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tieren sanken die Triglyzeridspiegel nach Beginn der Behandlung geringfügig ab und blieben im weiteren Versuchsverlauf annähernd konstant (Abb. III.4.1.c-4).

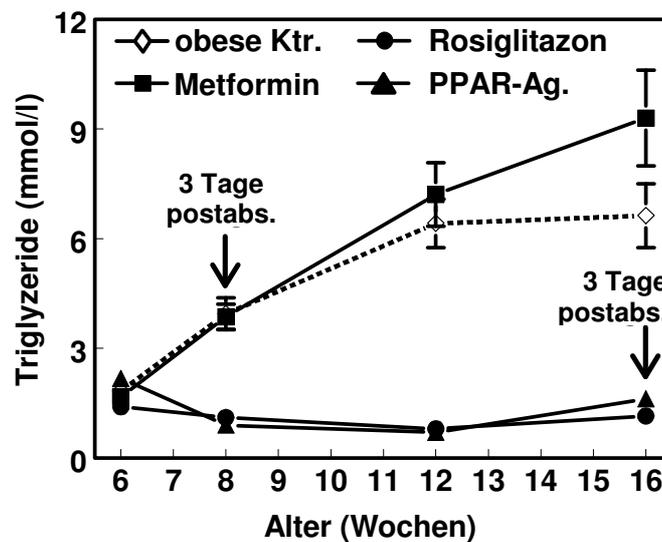


Abb. III.4.1.c-4 Verlauf der Triglyzeridspiegel behandelter ZDF-Ratten sowie von obesen Kontrolltieren während des 11-wöchigen Versuchsprotokolls (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; (n=7-8 pro Gruppe); postabs.: postabsorptive Phase; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

Die FFS im Serum lagen bei der Kontroll- sowie der Metformin-Gruppe über den gesamten Versuchszeitraum hinweg höher als bei den anderen untersuchten Tiergruppen. Die Serumkonzentrationen änderten sich während des Versuchs nur wenig (Abb. III.4.1.c-5).

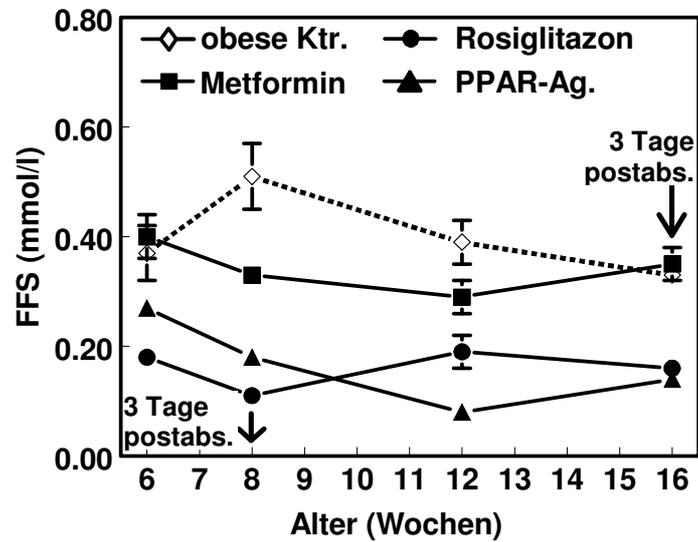


Abb. III.4.1.c-5 Verlauf der FFS behandelter ZDF-Ratten sowie von obesen Kontrolltieren während des 11-wöchigen Versuchsprotokolls (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; (n=7-8 pro Gruppe); postabs.: postabsorptive Phase; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

Die Ketonkörperkonzentration im Serum der Kontrollgruppe stieg zwischen der 8. und der 16. Lebenswoche kontinuierlich an. Ein analoger Verlauf war bei den mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tieren zu beobachten.

Bei der Rosiglitazon-Gruppe nahm die Ketonkörperkonzentration hingegen über den Versuchszeitraum ab und lag niedriger als in der Kontrollgruppe.

Die Ketonkörperspiegel der mit Metformin behandelten Tiere blieben nach einem anfänglichen Anstieg über die übrige Versuchsdauer hinweg konstant. Sie lagen höher als die der Kontrollgruppe (Abb. III.4.1.c-6).

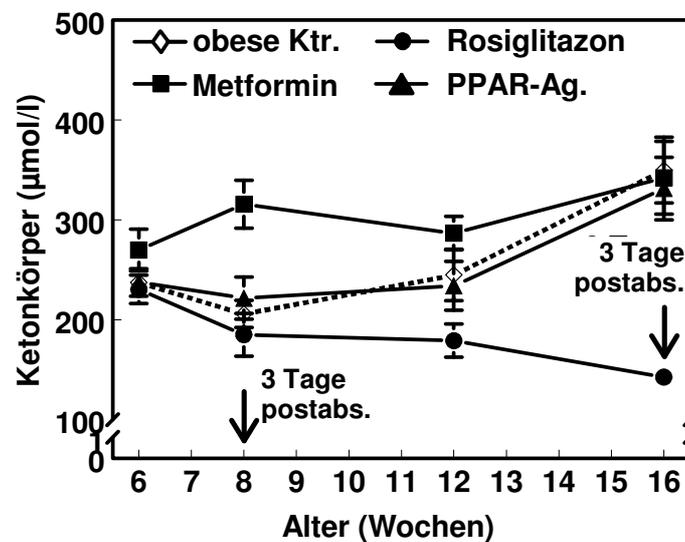


Abb. III.4.1.c-6 Verlauf der Ketonkörperspiegel behandelter ZDF-Ratten sowie von obesen Kontrolltieren während des 11-wöchigen Versuchsprotokolls (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; (n=7-8 pro Gruppe); postabs.: postabsorptive Phase; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

III.4.2 Bestimmung des Körperfettanteils

Der Körperfettanteil aller behandelten Tiere lag signifikant höher als derjenige der obesen Kontrollratten. Unter den behandelten Tieren hatte die Rosiglitazon-Gruppe den höchsten Körperfettanteil (Abb. III.4.2-1).

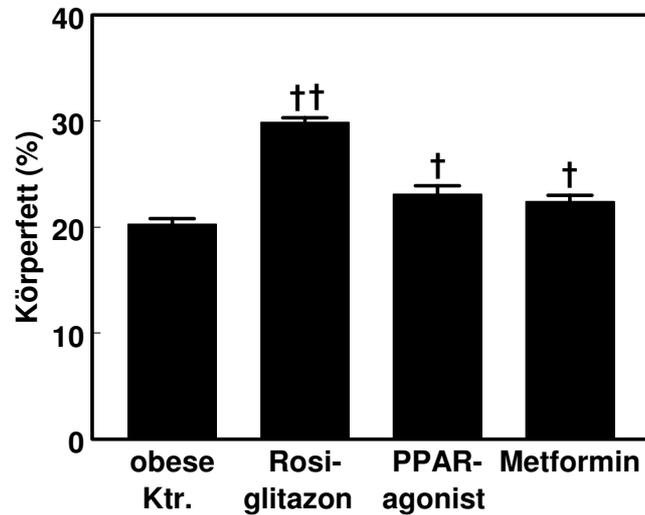


Abb. III.4.2-1 Körperfettanteil behandelter, obeser ZDF-Ratten sowie von obesen Kontrolltieren im Alter von 12 Wochen (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; (n=7-8 pro Gruppe), † $p < 0,05$ vs. obese Ktr.; †† $p < 0,001$ vs. obese Ktr.; PPAR-Agonist: PPAR- α -Agonist).

III.4.3 Bestimmung von Malonyl-CoA und LCACoA

III.4.3.a Malonyl-CoA in der Leber

Malonyl-CoA, endogener Inhibitor der Fettsäureoxidation, war in der Leber der mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tiere gegenüber allen anderen Gruppen hochsignifikant erhöht. Die übrigen Gruppen unterschieden sich nicht voneinander (Abb. III.4.3.a-1).

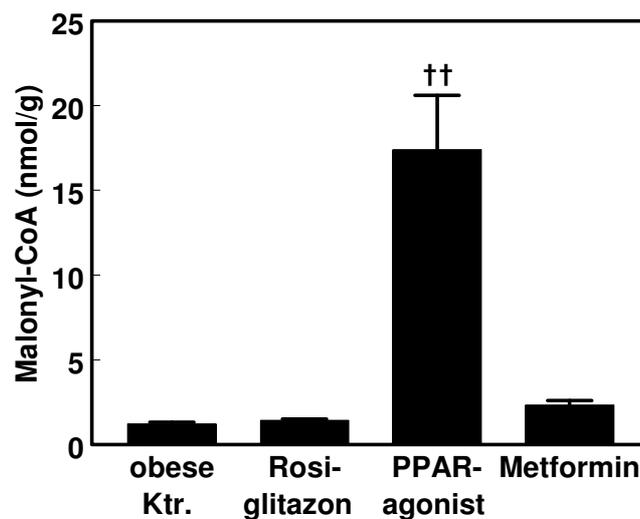


Abb. III.4.3.a-1 Malonyl-CoA in der Leber behandelter, obeser ZDF-Ratten sowie von obesen Kontrolltieren im Alter von 18 Wochen nach einer 24-stündigen postabsorptiven Periode (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; (n=7-8 pro Gruppe), †† p<0,001 vs. obese Ktr.; PPAR-Agonist: PPAR- α -Agonist).

III.4.3.b LCACoA-Gehalt in Skelettmuskel und Leber

Die Messung der LCACoA im LONG erfolgte bei diesen Tieren mit der für die LCACoA-Analytik der Leber modifizierten Methode. Damit konnte die Trennung der Peaks von Linoleoyl-CoA und Arachidonoyl-CoA erreicht werden.

Der Gehalt an LCACoA im LONG war bei den mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tieren signifikant gegenüber den obesen Kontrolltieren vermindert. Die übrigen behandelten Tiere zeigten ebenfalls eine tendenzielle Verminderung des LCACoA-Gehaltes.

Bei den einzelnen aktivierten Fettsäuren zeigte sich die Verminderung bei der mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Gruppe bei Palmitoyl-CoA, Linoleoyl-CoA und Arachidonoyl-CoA. Palmitoleoyl-CoA und Oleoyl-CoA waren bei allen Gruppen in vergleichbarer Konzentration vorhanden (Tab. III.4.3.b-1).

LCACoA-spezies	obese Kontrolle	Rosiglitazon	PPAR-Agonist	Metformin
C16:0	13,5 \pm 1,4	7,5 \pm 0,6 ^{††}	4,1 \pm 0,4 ^{††}	10,0 \pm 0,6 [†]
C16:1	4,4 \pm 0,7	3,2 \pm 0,4	3,1 \pm 0,2	3,8 \pm 0,1
C18:1	14,2 \pm 1,1	14,3 \pm 1,1	12,1 \pm 0,9	13,7 \pm 0,6
C18:2	10,8 \pm 0,5	2,0 \pm 0,2 ^{††}	1,7 \pm 0,2 ^{††}	3,7 \pm 0,2 ^{††}
C20:4	2,5 \pm 0,3	9,2 \pm 0,7 ^{††}	6,1 \pm 0,5 ^{††}	5,9 \pm 0,3 ^{††}
Gesamt	45,3\pm3,6	36,3\pm2,8	27,1\pm2,0^{††}	37,2\pm1,4

Tab. III.4.3.b-1 LCACoA-Gehalt im LONG behandelter, obeser ZDF-Ratten sowie von obesen Kontrolltieren im Alter von 18 Wochen nach einer 24-stündigen postabsorptiven Periode (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; (n=7-8 pro Gruppe), † p<0,05 vs. obese Ktr.; †† p<0,001 vs. obese Ktr.; PPAR-Agonist: PPAR- α -Agonist).

In der Leber lag der LCACoA-Gehalt der mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tiere deutlich höher als in der Kontrollgruppe. Die Konzentration der aktivierten Fettsäuren lag bei den mit Metformin behandelten Tieren im Bereich der Kontrollgruppe. Die mit Rosiglitazon behandelten Tiere hatten eine tendenziell niedrigere LCACoA-Konzentration in der Leber als die Kontrollgruppe.

Die einzelnen aktivierten Fettsäuren lagen bei den mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tieren mit Ausnahme von Linoleoyl-CoA signifikant höher als bei der Kontrollgruppe. Linoleoyl-CoA war gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt.

Bei der mit Rosiglitazon behandelten Gruppe war eine signifikante Erhöhung von Palmitoleoyl-CoA sowie eine signifikante Erniedrigung von Linoleoyl-CoA gegenüber der unbehandelten Gruppe zu messen.

Die LCACoA-Konzentrationen der mit Metformin behandelten Tiere lagen, mit Ausnahme von Linoleoyl-CoA, im Bereich der unbehandelten Kontrollgruppe. Linoleoyl-CoA war im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt (Tab. III.4.3.b-2).

LCACoA-spezies	obese Kontrolle	Rosiglitazon	PPAR-Agonist	Metformin
C16:0	80,7 \pm 8,1	72,1 \pm 1,8	169 \pm 7 ^{††}	85,9 \pm 5,1
C16:1	21,8 \pm 3,9	45,5 \pm 1,4 ^{††}	47,0 \pm 4,8 ^{††}	30,1 \pm 1,5
C18:0	24,0 \pm 1,3	28,7 \pm 0,5	36,0 \pm 2,3 ^{††}	25,4 \pm 1,2
C18:1	79,7 \pm 8,6	61,5 \pm 2,3	270 \pm 9,0 ^{††}	87,2 \pm 3,8
C18:2	84,8 \pm 12,8	38,4 \pm 5,4 ^{††}	50,3 \pm 7,5 [†]	47,3 \pm 3,5 [†]
C20:4	80,9 \pm 4,6	70,4 \pm 3,7	145 \pm 11 ^{††}	75,0 \pm 4,0
Gesamt	372\pm29	317\pm9	716\pm32^{††}	351\pm11

Tab. III.4.3.b-2 LCACoA-Gehalt in der Leber behandelter, obeser ZDF-Ratten sowie von obesen Kontrolltieren im Alter von 18 Wochen nach einer 24-stündigen postabsorptiven Periode (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; (n=7-8 pro Gruppe), [†] p<0,05 vs. obese Ktr.; ^{††} p<0,001 vs. obese Ktr.; PPAR-Agonist: PPAR- α -Agonist).

III.5 Postabsorptionsstudie bei ZDF-Ratten unter Behandlung mit Antidiabetika

III.5.1 Physiologische Parameter

Im Alter von 8 Wochen nahmen alle untersuchten Gruppen während der postabsorptiven Phase an Gewicht ab. Nach Wiederaanfütterung erhöhte sich bei allen Gruppen das Körpergewicht wieder.

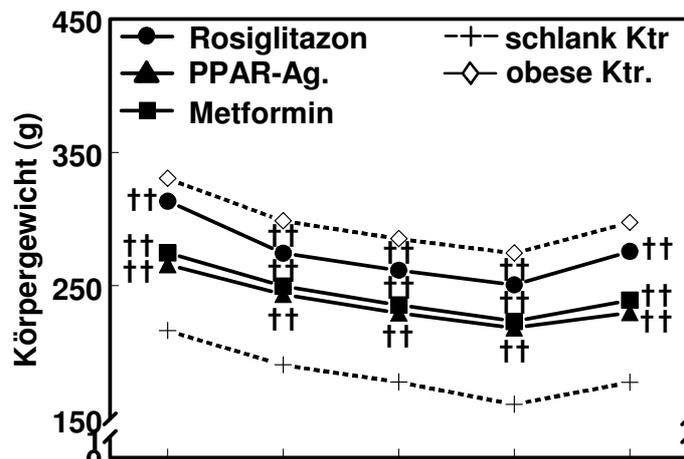
Das Körpergewicht aller behandelten Tiere lag während des gesamten Versuches höher als bei der schlanken Kontrollgruppe und niedriger als bei den obesen Kontrollen der Studie (III.2).

Von den behandelten Tieren war die Rosiglitazon-Gruppe die schwerste, die PPAR- α -Agonist-Gruppe die leichteste.

Im Alter von 16 Wochen nahm das Körpergewicht aller untersuchten Gruppen postabsorptiv ebenfalls ab. Bei Wiederaanfütterung wurde jedoch bei den mit Metformin und den mit dem PPAR- α -Agonist behandelten Tieren keine Zunahme des Körpergewichtes beobachtet.

Das Körpergewicht der mit Rosiglitazon behandelten Tiere lag über den gesamten Versuchszeitraum hinweg deutlich höher als das der anderen Gruppen. Die mit Metformin behandelten Tiere waren ebenfalls schwerer als die Kontrolltiere. Das Körpergewicht der mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tiere lag im Bereich der obesen Kontrollgruppe von Studie (III.3) (Abb. III.5.1-1).

8 Wo.



16 Wo.

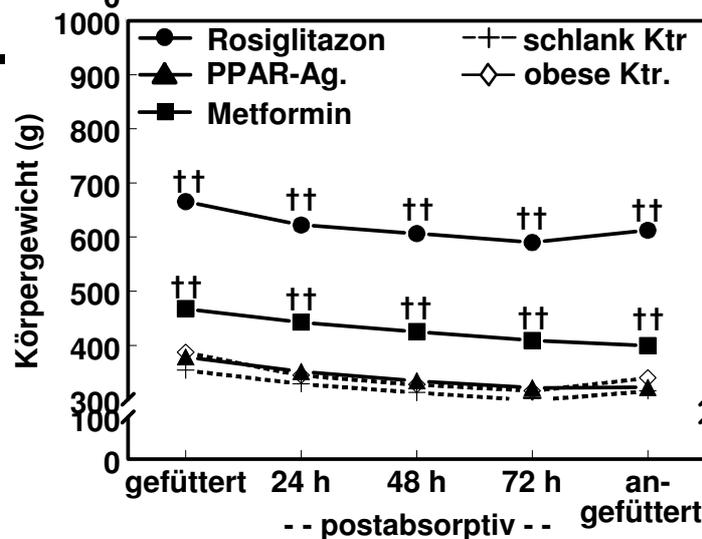


Abb. III.5.1-1 Verlauf des Körpergewichtes behandelter, obeser ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere. (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; $\dagger\dagger$ $p < 0,001$ vs. obese Ktr. ($n=8$ pro Gruppe); Werte der Kontrollgruppen entstammen Versuch III.2 bzw. Versuch III.3; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

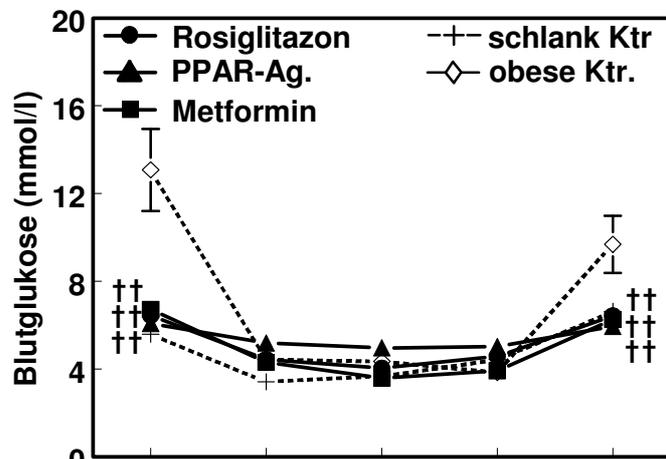
III.5.2 Stoffwechselfparameter im Serum

Sowohl bei den 8 als auch bei den 16 Wochen alten Tieren war postabsorptiv bei allen untersuchten Gruppen ein Absinken der Blutglukose zu beobachten. Bei Wiederanfütterung stieg die Glukose wieder auf den Ausgangswert an.

Die Blutglukosespiegel lagen bei den behandelten Tieren im gefütterten Zustand sowie nach Wiederanfütterung signifikant niedriger als bei der obesen Kontrollgruppe.

Im Alter von 16 Wochen war die Blutglukose der mit Rosiglitazon und Metformin behandelten Tiere auch an den ersten beiden Tagen der postabsorptiven Phase signifikant niedriger als bei den obesen Kontrollen (Abb. III.5.2-1).

8 Wo.



16 Wo.

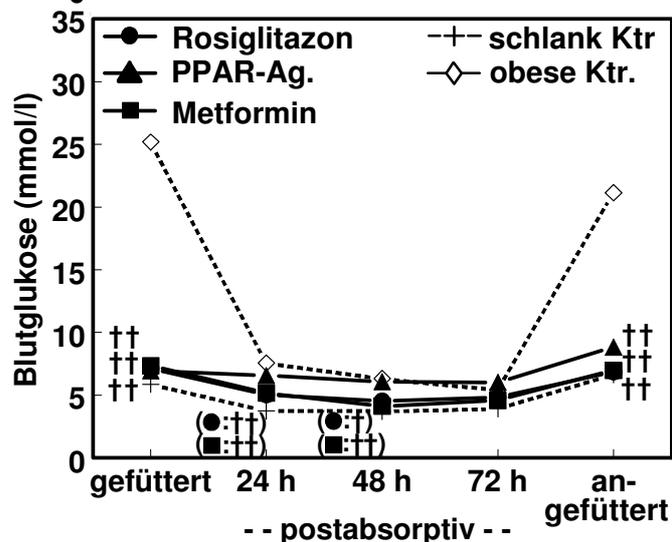


Abb. III.5.2-1 Verlauf der Blutglukose behandelter, obeser ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere. (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; † $p < 0,05$; †† $p < 0,001$ vs. obese Ktr. ($n=8$ pro Gruppe); Werte der Kontrollgruppen entstammen Versuch III.2 bzw. Versuch III.3; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

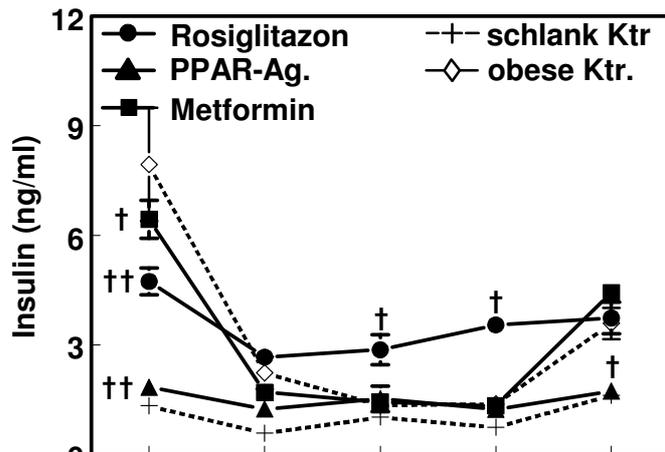
Im Alter von 8 Wochen lagen die Insulinspiegel der behandelten Tiere im gefütterten Zustand niedriger als die der obesen Kontrollen, jedoch höher als diejenigen der schlanken Kontrollgruppe. Den schlanken Kontrolltieren am nächsten kamen dabei die mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tiere.

Postabsorptiv sanken die Insulinspiegel aller Gruppen deutlich ab. Die Serumspiegel bei den mit Rosiglitazon behandelten Tiere lagen dabei am 2. und 3. Tag der postabsorptiven Phase signifikant höher als bei den obesen Kontrolltieren.

Nach Wiederaanfütterung lagen die Insulinspiegel von Rosiglitazon- und Metformin-Gruppe auf demselben Niveau wie die obese Kontrollgruppe. Die Tiere, welche mit dem PPAR- α -Agonisten behandelt wurden, hatten nach Anfütterung niedrigere Insulinspiegel als die obesen Kontrollen.

Im Alter von 16 Wochen war grundsätzlich der gleiche Verlauf wie bei den jüngeren Tieren zu beobachten. Bei diesen Tieren war jedoch in gefüttertem Zustand der Insulinspiegel der mit Metformin behandelten Tiere höher als derjenige der obesen Kontrollgruppe. Die postabsorptiven Insulinspiegel lagen bei der PPAR- α -Agonist-Gruppe signifikant niedriger als bei der obesen Kontrollgruppe (Abb. III.5.2-2).

8 Wo.



16 Wo.

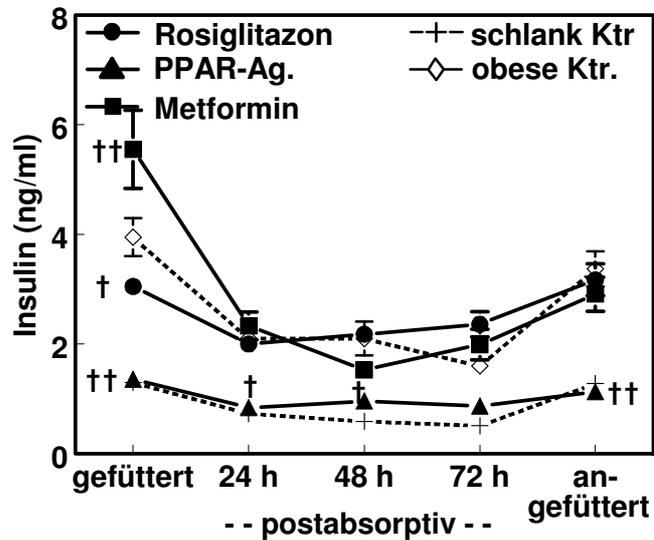


Abb. III.5.2-2 Verlauf der Insulinspiegel behandelter, obeser ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere. (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; † $p < 0,05$; †† $p < 0,001$ vs. obese Ktr. ($n=8$ pro Gruppe)); Werte der Kontrollgruppen entstammen Versuch III.2 bzw. Versuch III.3; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

Die Serumtriglyzeride der 8 Wochen alten, behandelten Ratten lagen im gefütterten Zustand niedriger als diejenigen der obesen Kontrollen. Dabei waren die niedrigsten Werte bei den mit Rosiglitazon bzw. mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tieren zu finden.

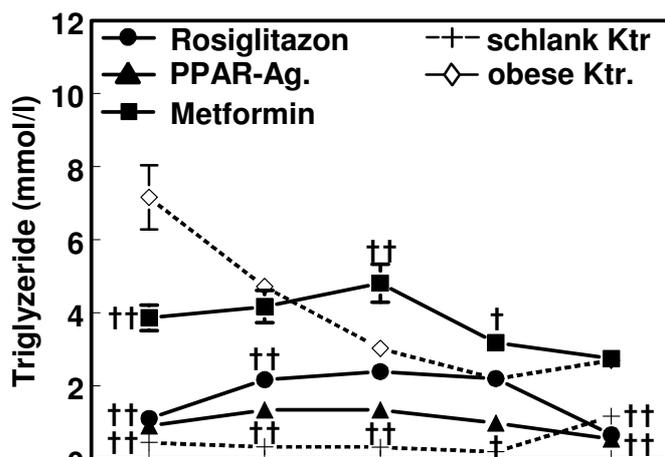
Während der postabsorptiven Phase zeigten die Triglyzeridspiegel der behandelten Tiere einen, sowohl von den obesen als auch von den schlanken Kontrolltieren, abweichenden Verlauf: Während sie bei der unbehandelten Gruppe postabsorptiv absanken, stiegen sie bei den behandelten Tieren während der postabsorptiven Phase an. Dieser Anstieg war bei den mit Rosiglitazon bzw. dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tieren am deutlichsten ausgeprägt.

Nach Wiederanfütterung kam es bei den behandelten Tieren zu einem Absinken der Triglyzeridkonzentration, während bei beiden Kontrollgruppen am 5. Versuchstag gegenüber dem 3. Tag ein Anstieg der Triglyzeridspiegel zu sehen war.

Im Alter von 16 Wochen lagen die Triglyzeridspiegel der mit Metformin behandelten Tiere signifikant höher als diejenigen der obesen Kontrollgruppe. Die PPAR- α -Agonist- sowie die Rosiglitazon-Gruppe zeigten im gesamten Versuchszeitraum gegenüber der obesen Kontrollgruppe erniedrigte Triglyzeridspiegel.

Während des gesamten Versuchsprotokolls sanken die Triglyzeridspiegel in der Metformin-Gruppe kontinuierlich ab. Bei den übrigen behandelten Tieren kam es postabsorptiv zu einem Anstieg der Triglyzeride im Serum und bei Wiederanfütterung zu einem Absinken der Blutspiegel (Abb. III.5.2-3).

8 Wo.



16 Wo.

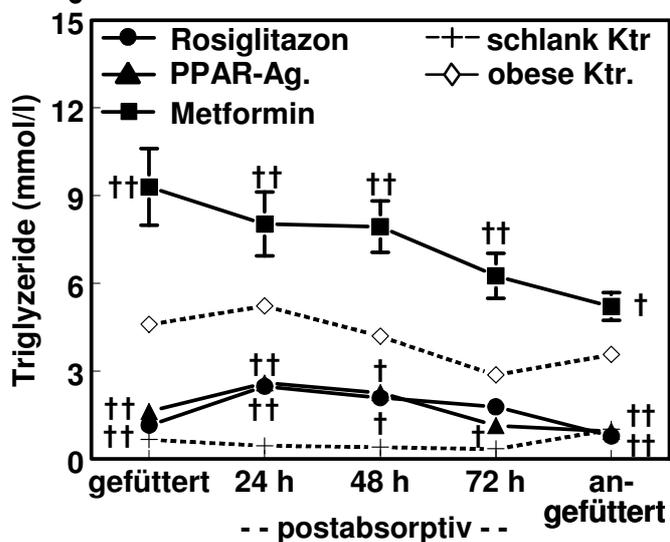
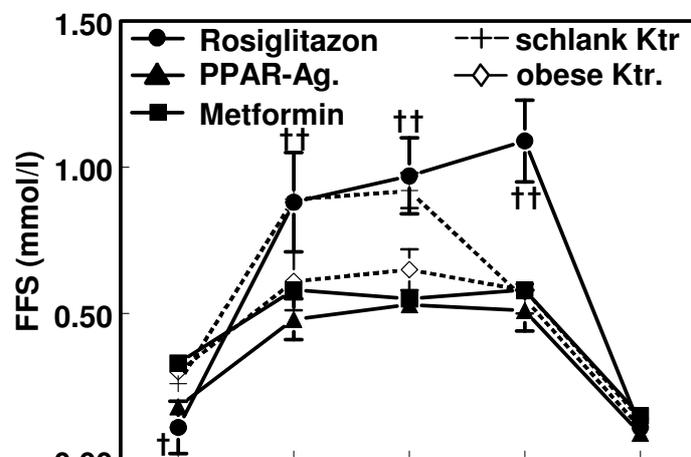


Abb. III.5.2-3 Verlauf der Triglyzeridspiegel behandelter, obeser ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase, sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere. (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; † $p < 0,05$; †† $p < 0,001$ vs. obese Ktr. ($n=8$ pro Gruppe); Werte der Kontrollgruppen entstammen Versuch III.2 bzw. Versuch III.3; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

Die FFS der behandelten Tiere im Alter von 8 Wochen lagen, mit Ausnahme der mit Rosiglitazon behandelten Gruppe, während des gesamten Versuchsprotokolls auf dem gleichen Niveau wie diejenigen der obesen Kontrolltiere. Die mit Rosiglitazon behandelten Tiere zeigten denselben Verlauf, erreichten jedoch, ebenso wie die schlanken Kontrolltiere, postabsorptiv höhere Blutspiegel.

Im Alter von 16 Wochen war der gleiche Verlauf wie schon im Alter von 8 Wochen beobachtet zu erkennen. Allerdings war das Absinken der FFS bei Wiederanfütterung bei den mit Metformin sowie dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tiere weniger deutlich zu sehen (Abb. III.5.2-4).

8 Wo.



16 Wo.

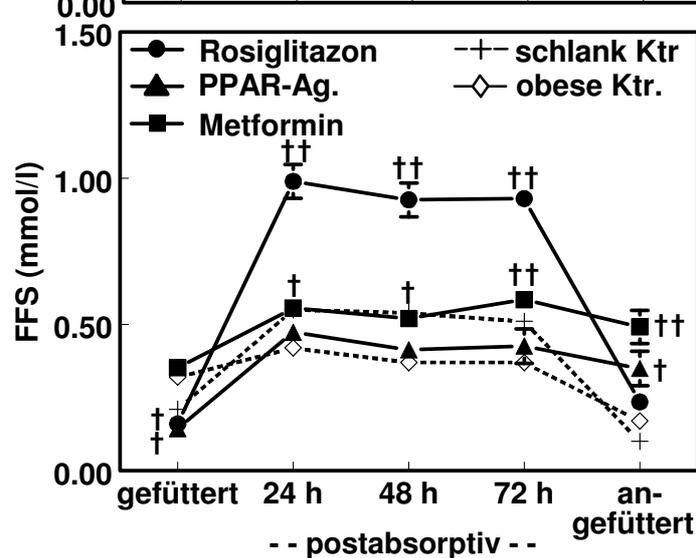


Abb. III.5.2-4 Verlauf der FFS behandelter, obeser ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere. (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; † $p < 0,05$; †† $p < 0,001$ vs. obese Ktr. ($n=8$ pro Gruppe); Werte der Kontrollgruppen entstammen Versuch III.2 bzw. Versuch III.3; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

Bei den Ketonkörperspiegeln zeigten im Alter von 8 Wochen alle behandelten Gruppen den gleichen Verlauf wie die obesen Kontrollratten. Lediglich die mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tiere erreichten am dritten Tag der postabsorptiven Periode ein niedrigeres Niveau als die übrigen obesen Ratten.

Im Alter von 16 Wochen war der gleiche Verlauf wie schon im Alter von 8 Wochen zu beobachten. Die mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tiere erreichten dabei mit über 7000 $\mu\text{mol/l}$ die mit Abstand höchsten Blutspiegel (Abb. III.5.2-5).

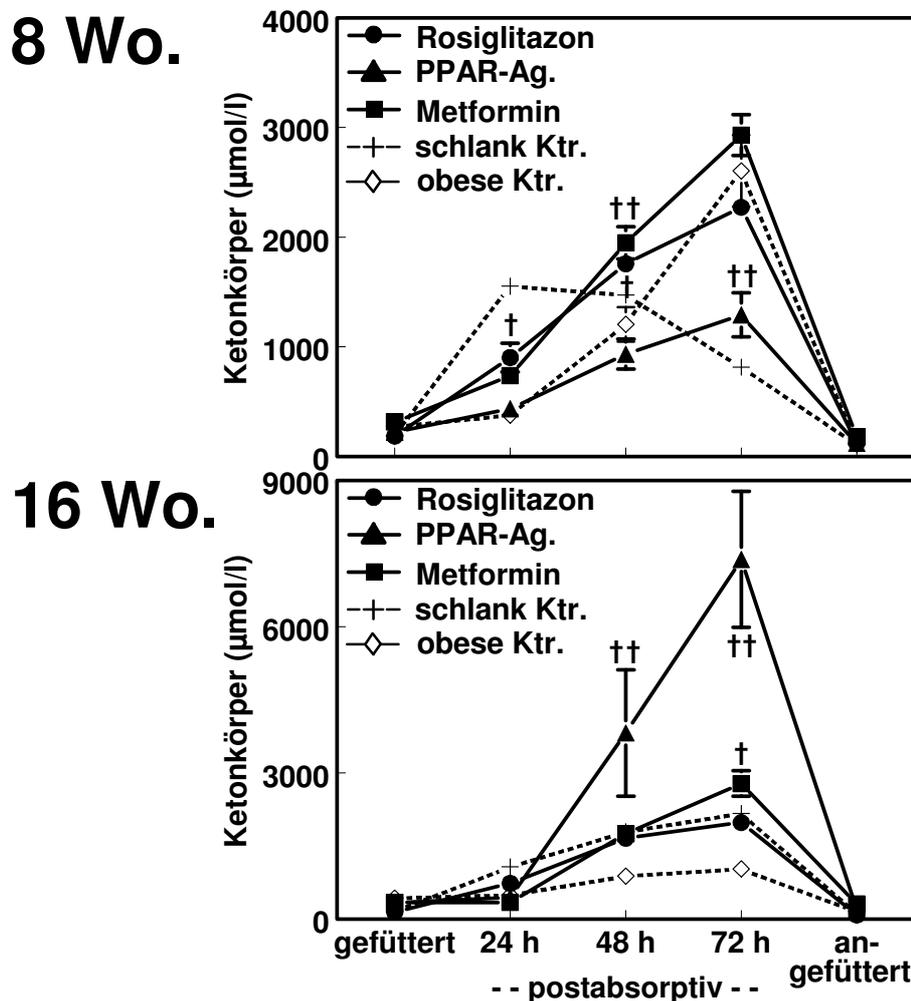


Abb. III.5.2-5 Verlauf der Gesamt-Ketonkörperspiegel behandelter, obeser ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere. (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; † $p < 0,05$; †† $p < 0,001$ vs. obese Ktr. ($n=8$ pro Gruppe); Werte der Kontrollgruppen entstammen Versuch III.2 bzw. Versuch III.3; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

Betrachtet man den Verlauf der einzelnen gemessenen Ketonkörper (Acetoacetat und HO-Butyrat), so fällt auf, dass der Anstieg der Gesamt-Ketonkörper bei den mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tieren im wesentlichen von einem Anstieg des Acetoacetat verursacht wurde. Bei allen anderen Gruppen hingegen war primär der Anstieg von HO-Butyrat für die postabsorptiv steigenden Ketonkörperspiegel verantwortlich (Abb. III.5.2-6).

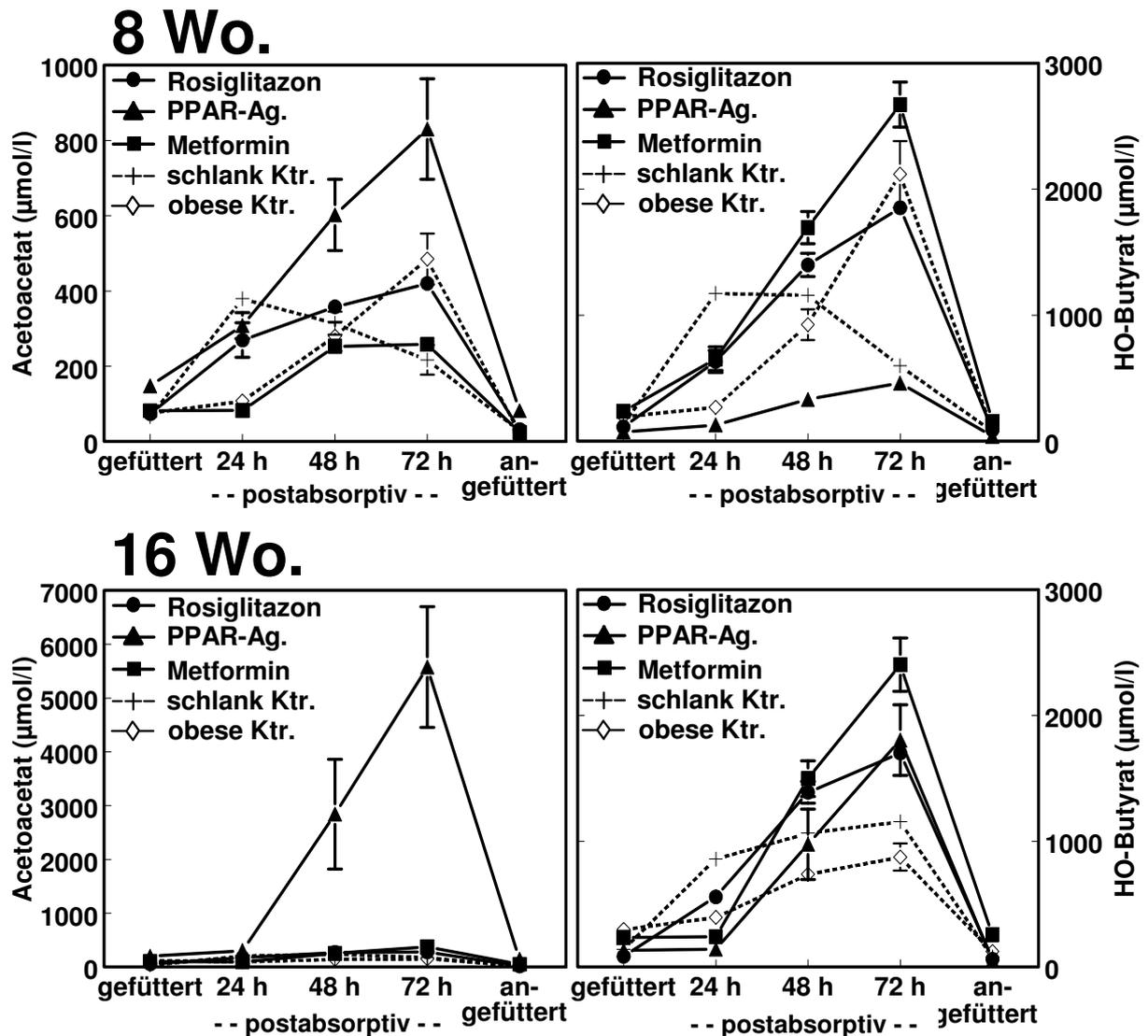


Abb. III.5.2-6 Verlauf von Acetoacetat und Hydroxy (HO)- Butyrat behandelter, obeser ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere. (Werte sind Mittelwerte \pm SEM (n=8 pro Gruppe); Werte der Kontrollgruppen entstammen Versuch III.2 bzw. Versuch III.3; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

III.5.3 ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen

III.5.3.a IMCL-Gehalt verschiedener Skelettmuskeltypen

Im Alter von 8 Wochen lagen in allen untersuchten Skelettmuskeltypen die IMCL-Werte der mit Rosiglitazon bzw. dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tiere im gefütterten Zustand niedriger als diejenigen der obesen Kontrolltiere. Die IMCL-Werte der mit Metformin behandelten Tiere zeigten ebenfalls eine Tendenz zu niedrigeren Werten. Hier konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Im Alter von 16 Wochen waren im gefütterten Zustand der Tiere keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mehr zu erkennen.

Im TIB (Abb. III.5.3.a-1) sowie im EDL (Abb. III.5.3.a-2) konnte, wie auch bei den unbehandelten Gruppen, im Alter von 8 Wochen ein postabsorptiver IMCL-Anstieg ermittelt werden.

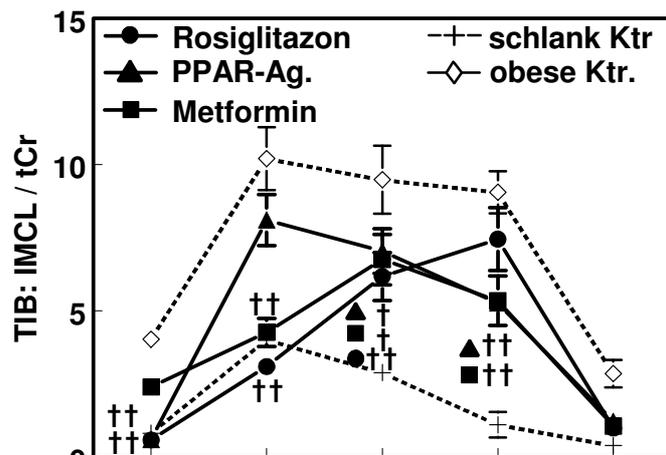
Mit diesem Anstieg erreichten die mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tiere im TIB sowie im EDL ähnlich hohe IMCL-Werte wie die obesen Kontrolltiere.

Der postabsorptive Anstieg fiel bei den mit Rosiglitazon und Metformin behandelten Tieren geringer aus als derjenige der mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Gruppe. Diese Tiere erreichten postabsorptiv das Niveau der obesen Kontrolltiere.

Nach Wiederaanfütterung sanken die IMCL-Werte bei allen Gruppen wieder auf den Ausgangswert ab.

Im Alter von 16 Wochen war im TIB postabsorptiv ein deutlicher Anstieg zu beobachten. Dabei wurden in allen Behandlungsgruppen höhere IMCL-Werte als bei der obesen Kontrollgruppe gemessen (Abb. III.5.3.a-1).

8 Wo.



16 Wo.

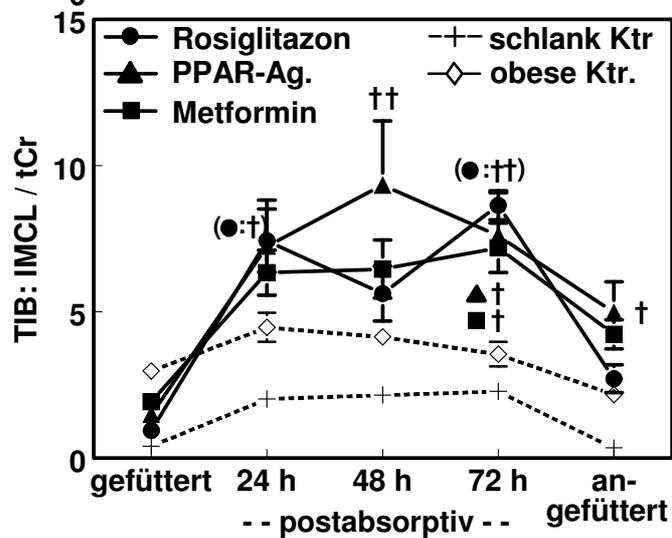
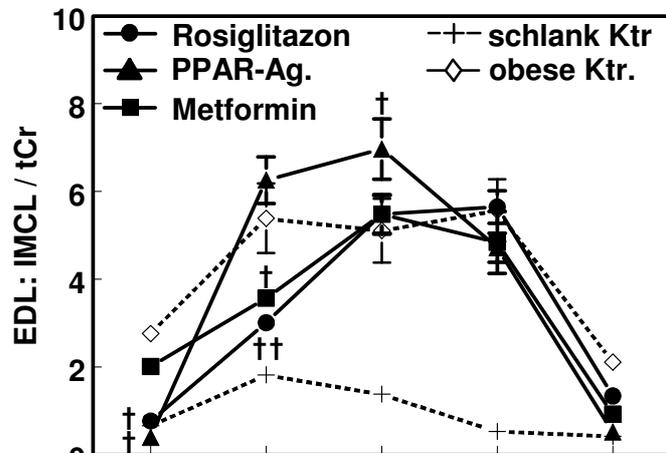


Abb. III.5.3.a-1 Verlauf des IMCL-Gehaltes im M. Tibialis Anterior (TIB) behandelter, obeser ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere. (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; † $p < 0,05$; †† $p < 0,001$ vs. obese Ktr. ($n=8$ pro Gruppe); Werte der Kontrollgruppen entstammen Versuch III.2 bzw. Versuch III.3; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

Im EDL war sowohl bei der PPAR- α -Agonist-Gruppe als auch bei der Metformin-Gruppe ebenfalls ein deutlicher postabsorptiver Anstieg zu messen. Bei den mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tieren wurden signifikant höhere IMCL-Werte als bei den obesen Kontrolltieren erreicht. Die Messung der mit Rosiglitazon behandelten Tiere erbrachte am 1. und am 5. Versuchstag aufgrund des störenden adipozytären Fettes, welches bei dieser Gruppe vermehrt vorhanden war, keine auswertbaren Ergebnisse. Das Methylensignal des adipozytären Fettes erscheint bei 1,5 ppm. Bei gefütterten Tieren überdeckte dieser Peak das sehr kleine Signal des IMCL. Postabsorptiv wurden bei dieser Gruppe IMCL-Werte erreicht, welche deutlich höher lagen als diejenigen der obesen Kontrollgruppe. Nach

Wiederanfütterung sanken die IMCL-Werte der PPAR- α -Agonist- sowie der Metformin-Gruppe nur geringfügig ab (Abb. III.5.3.a-2).

8 Wo.



16 Wo.

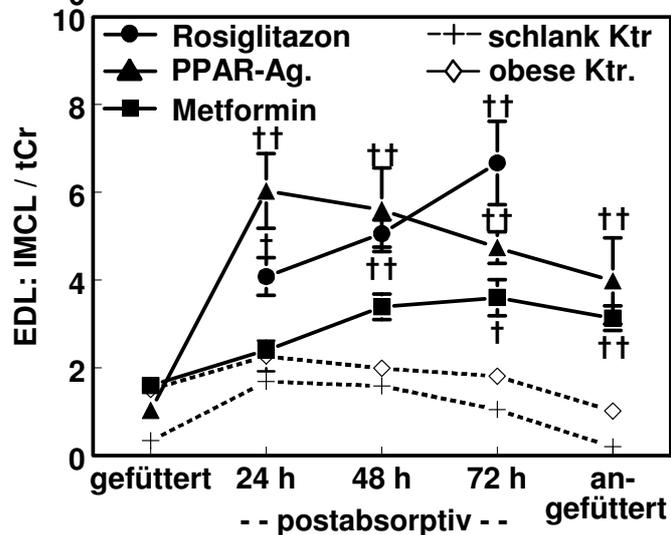
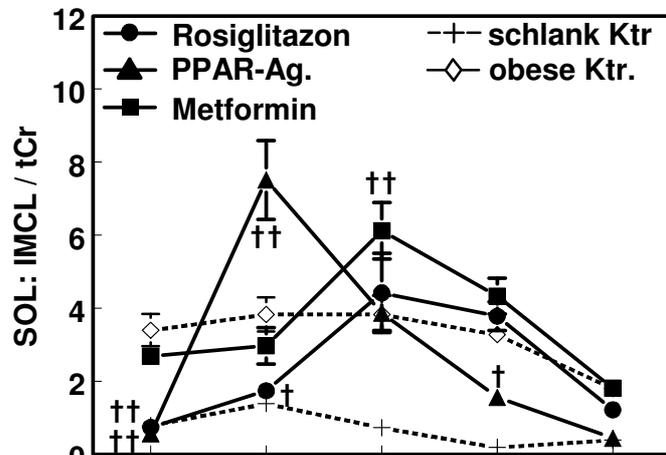


Abb. III.5.3.a-2 Verlauf des IMCL-Gehaltes im M. Extensor Digitorum Longus (EDL) behandelter, obeser ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere. (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; † $p < 0,05$; †† $p < 0,001$ vs. obese Ktr. ($n=8$ pro Gruppe); Werte der Kontrollgruppen entstammen Versuch III.2 bzw. Versuch III.3; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

Im SOL wurden bei den unbehandelten Tieren keine Änderungen des IMCL-Gehaltes im Versuchsverlauf gemessen. Bei allen 3 behandelten Gruppen konnte hingegen in beiden Altersstufen ein Anstieg der IMCL-Werte während der postabsorptiven Phase festgestellt werden. Dabei wurden im Alter von 8 Wochen teilweise, im Alter von 16 Wochen hingegen generell die Werte der obesen Kontrollgruppe übertroffen. Im Alter von 16 Wochen waren bei den mit Metformin behandelten Tieren die geringsten Änderungen des IMCL-Gehaltes im SOL zu erkennen. Bei Anfütterung am letzten Versuchstag sanken die IMCL-Werte im SOL bei allen Gruppen in beiden Altersstufen wieder auf den Ausgangswert ab (Abb. III.5.3.a-3).

8 Wo.



16 Wo.

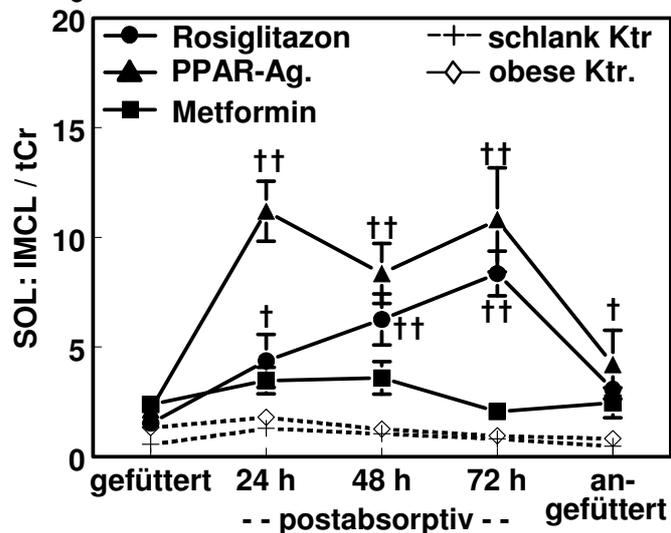


Abb. III.5.3.a-3 Verlauf des IMCL-Gehaltes im M. Soleus (SOL) behandelter, obeser ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere. (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; † $p < 0,05$; †† $p < 0,001$ vs. obese Ktr. ($n=8$ pro Gruppe); Werte der Kontrollgruppen entstammen Versuch III.2 bzw. Versuch III.3; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

III.5.3.b Hepatozellulärer Lipidgehalt

Im Alter von 8 Wochen lagen die HepCL-Werte der gefütterten Tiere bei den mit Rosiglitazon bzw. Metformin behandelten Tieren auf demselben Niveau wie bei den obesen Kontrollen. Die mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tiere lagen tendenziell im gefütterten Zustand etwas niedriger.

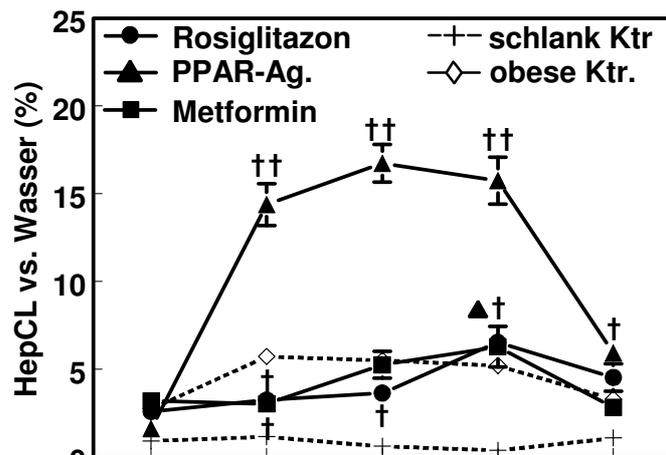
Während der postabsorptiven Phase stiegen die HepCL-Werte der PPAR- α -Agonist-Gruppe jedoch sehr stark an. Bei den anderen behandelten Gruppen kam es nur gegen Ende der postabsorptiven Phase zu einem leichten Anstieg gegenüber dem gefütterten Zustand.

Mit Wiederaufütterung sank der HepCL-Gehalt bei allen behandelten Gruppen wieder ab (Abb. III.5.3.b-1).

Im Alter von 16 Wochen lagen die HepCL-Werte der gefütterten Tiere bei der PPAR- α -Agonist- sowie der Rosiglitazon-Gruppe signifikant niedriger als bei den mit Metformin behandelten Tieren.

Bei allen behandelten Tieren erfolgte postabsorptiv ein Anstieg des HepCL, welcher bei der Metformin-Gruppe am geringsten und bei der PPAR- α -Agonist-Gruppe am deutlichsten ausfiel. Nach 24-stündiger Wiederaufütterung blieben die Werte aller Gruppen auf dem postabsorptiv erreichten Niveau (Abb. III.5.3.b-1).

8 Wo.



16 Wo.

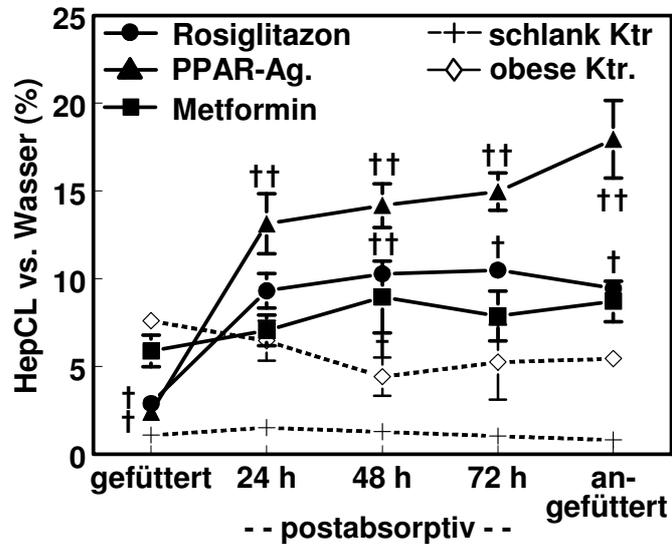


Abb. III.5.3.b-1 Verlauf des HepCL-Gehaltes behandelter, obeser ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase, sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere. (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; † $p < 0,05$; †† $p < 0,001$ vs. obese Ktr. ($n=8$ pro Gruppe); Werte der Kontrollgruppen entstammen Versuch III.2 bzw. Versuch III.3; PPAR-Ag.: PPAR- α -Agonist).

IV Diskussion

IV.1 Biochemische und biophysikalische Veränderungen während postabsorptiver adipozytärer Lipolyse

Die FFS, deren Plasmaspiegel bei obesen Individuen erhöht sind, stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen Obesitas und Insulinresistenz dar (BODEN, 1997). Das Phänomen der Insulinresistenz korreliert sowohl im Tiermodell Ratte als auch beim Menschen mit dem IMCL-Gehalt (KUHLMANN, 2002; JACOB et al, 1999; KRSSAK et al 1999; PERSEGHIN et al, 1999). Der hepatische Lipidgehalt korreliert beim Menschen mit einer verminderten insulinvermittelten Hemmung der hepatischen Glukoseproduktion (SEPPÄLÄ-LINDROOS et al, 2002).

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Studien sollten, neben der Charakterisierung eines neuen PPAR- α -Agonisten, die Zusammenhänge zwischen akut, physiologisch erhöhtem Angebot an FFS im Plasma und intrazellulärem Lipid in verschiedenen Geweben näher untersuchen. Dabei konnten einige unerwartete Beobachtungen gemacht werden:

- Veränderungen im IMCL können innerhalb weniger Stunden auftreten
- Muskeln mit unterschiedlicher Fasertypzusammensetzung reagieren unterschiedlich auf erhöhte FFS-Spiegel im Plasma
- Bei postabsorptiver adipozytärer Lipolyse werden aus dem Fettgewebe mehr FFS freigesetzt, als aktuell zur Energieversorgung benötigt werden
- Erhöhte Lipolyseraten in den Adipozyten resultieren in erhöhter Reveresterungsrate in glykolytischen Skelettmuskeln
- Eine Erhöhung von IMCL verhindert bei insulin sensitiven Tieren die Erhöhung der muskulären LCACoA-Konzentration
- Insulinresistente Tiere sind nicht in der Lage die muskuläre LCACoA-Konzentration bei erhöhter adipozytärer Lipolyse konstant zu halten
- In der Leber erhöht sich unter postabsorptiven Bedingungen die LCACoA-Konzentration
- Die Bildung von HepCL scheint kein protektiver Mechanismus zur Vermeidung hoher LCACoA-Konzentrationen zu sein
- Bei insulinresistenten Tieren kommt es postabsorptiv zu einer Erhöhung des HepCL-Gehaltes
- Bei insulinresistenten Tieren liegt in der Leber postabsorptiv ein Missverhältnis zwischen Lipidaufnahme, Lipidoxidation und VLDL-Sekretion vor
- Insulinresistente Tiere zeigen einen erhöhten C16:1-Anteil in Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe
- Unter postabsorptiven Bedingungen zeigte C16:1 in der Leber eine zu den anderen Fettsäuren inverse Dynamik
- Die metabolischen Veränderungen unter veränderten nutritiven Bedingungen sind bei diabetischen Ratten abgeschwächt
- Die Behandlung mit PPAR-Agonisten führt zu einer Absenkung von IMCL und HepCL
- Die Behandlung mit PPAR-Agonisten bewirkt einen postabsorptiven Anstieg von IMCL in allen Muskelfasertypen

IV.1.1 Insulinsensitive Wistar-Ratten

Die postabsorptiven Veränderungen der metabolischen Serumparameter sind seit langem bekannt (LÖFFLER, 1997):

Bei Nahrungsentzug sinken sowohl die Glukose- als auch die Triglyzeridspiegel im Serum ab. Aufgrund der verminderten Glukose-induzierten Stimulation sinken nachfolgend auch die Serum-Insulinspiegel. Dadurch fällt die antilipolytische Wirkung von Insulin auf das Fettgewebe weg. Um weiterhin eine ausreichende Energieversorgung der peripheren Gewebe zu gewährleisten, kommt es zur adipozytären Lipolyse und damit zu einem Anstieg der FFS im Serum. Resultierend aus der postabsorptiv erhöhten β -Oxidationsrate produzieren die Mitochondrien der Leber vermehrt Ketonkörper. Diese werden ins Blut abgegeben. Die FFS und die Ketonkörper dienen postabsorptiv als Hauptenergiequelle für die peripheren Organe, während die Glukose für die Versorgung des zentralen Nervensystems aufgespart wird (CAHILL et al, 1968).

Die Resultate der Studie an Wistar-Ratten zeigen, dass postabsorptiv aus dem Fettgewebe mehr FFS freigesetzt als aktuell von den Geweben zur Energieversorgung benötigt werden. In nicht-adipozytären Geweben kommt es daher zur Reveresterung von FFS. Aus der Leber können diese reveresterten Fettsäuren als VLDL-Triglyzeride (Very-Low-Density-Lipoprotein) in das Gefäßsystem abgegeben werden. Die Aktivität der muskulären Lipoproteinlipase (mLPL) ist postabsorptiv gegenüber der adipozytären Lipoproteinlipase (aLPL) erhöht (LADU et al, 1991). Zusätzlich zu den FFS aus der adipozytären Lipolyse werden daher Fettsäuren triglyzeridreicher Lipoproteine in die Skelettmuskelzelle aufgenommen. Die Speicherung in der Muskulatur erfolgt in Form von Lipid-Droplets, die mittels ^1H -NMR-Spektroskopie als IMCL messbar sind.

Die in der postabsorptiven Phase erhöhten IMCL-Spiegel im glykolytischen (TIB) und intermediären Muskel (EDL) spiegeln diese Reveresterung wider (Abb. III.1.3.a-1). Im oxidativen SOL war dagegen während der postabsorptiven Phase kein Anstieg intrazellulärer Lipide messbar. In diesem Muskel scheint trotz erhöhter Lipidverfügbarkeit kein Missverhältnis aus Fettsäureaufnahme und β -Oxidationsrate zu entstehen.

Einige Studien beim Menschen untersuchten ebenfalls die Dynamik des IMCL an gesunden Probanden. Akute Veränderungen des IMCL-Spiegel konnten nach Lipidinfusion (BODEN et al, 2001, BRECHTEL et al, 2001), bei Ausdauertraining

(SCHRAUWEN-HINDERLING et al, 2003; BRECHTEL et al 2001; KRSSAK et al, 2000) sowie nach 72-stündiger Nahrungskarenz (STANNARD et al, 2002) beobachtet werden.

In dieser Studie konnte ein Anstieg des IMCL-Spiegels in den glykolytischen Muskeln der Wistar-Ratte bereits nach einer 12-stündigen postabsorptiven Phase beobachtet werden. Nach 24-stündiger Wiederanfütterung war der IMCL-Gehalt bereits wieder auf das Ausgangsniveau abgesunken (Abb. III.1.3.a-1). Diese Ergebnisse sprechen für eine ausgeprägte physiologische Dynamik des IMCL-Pools. Dies zeigt deutlich, dass bei der Ratte für die Verwendung von IMCL als Surrogat für Insulinresistenz die genaue Kenntnis der nutritiven Bedingungen unerlässlich ist.

Von der Leber aufgenommene FFS können als VLDL-Triglyzeride wieder an das Gefäßsystem abgegeben oder aber als Lipid-Droplet gespeichert werden. Sie können des Weiteren vollständig oxidiert werden oder als Ketonkörper die Leber verlassen. Der HepCL-Gehalt blieb bei den Wistar-Ratten während der postabsorptiven Phase konstant (Abb. III.1.3.b-1). Die Leber scheint somit eine ausreichende Kapazität für die Oxidation und / oder die Bildung von VLDL-Partikeln zu haben, so dass es bei den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuchen nicht zu einer intrahepatischen Speicherung der Lipide kam.

Malonyl-CoA ist ein endogener Inhibitor der mitochondrialen Fettsäureoxidation in Leber (MCGARRY et al, 1978), pankreatischer β -Zelle (BRUN et al, 1996) und Skelettmuskel (RASMUSSEN et al, 2002; RUDERMAN et al, 1999). Durch eine von Malonyl-CoA vermittelte Hemmung von CPT-1 wird die Aufnahme der LCACoA in die Mitochondrien verhindert. In der Leber stellt Malonyl-CoA zusätzlich ein wichtiges Zwischenprodukt in der de-novo Fettsäuresynthese dar (WAKIL et al, 1983). Diese Funktion ist in der Skelettmuskulatur nur von nachgeordneter Bedeutung, da die Fettsäuresyntheserate im Muskelgewebe niedrig ist.

Bei niedrigen Blutglukosespiegeln ist die Malonyl-CoA-Konzentration in Skelettmuskulatur und Leber niedrig (SAHA et al, 1995), was einen ungehinderten Transport der LCACoA's in die Mitochondrien erlaubt. Das Absinken der Malonyl-CoA-Konzentration während der postabsorptiven Phase stellte sich in der Studie an Wistar-Ratten nicht so deutlich dar, wie es aufgrund der beschriebenen Funktion als regulatorisches Molekül zu erwarten gewesen wäre (Abb. III.1.4.b-1). Die gemessenen Malonyl-CoA-Konzentrationen liegen über dem K_i -Wert

(Dissoziationskonstante für den Enzym-Inhibitor-Komplex) für CPT-1-Hemmung, so dass die Fettsäureoxidation permanent inhibiert sein müsste. In diesem Zusammenhang wird das Vorhandensein eines Malonyl-CoA-Bindungsproteins oder signifikanter Malonyl-CoA-Konzentrationen in den Mitochondrien diskutiert (MCGARRY et al, 1997). Aufgrund der Kompartimentalisierung wäre dann nur ein kleiner Teil des biochemisch gemessenen Malonyl-CoA für die CPT-1-Hemmung verantwortlich. Im oxidativen SOL waren in der durchgeführten Studie die Änderungen der Malonyl-CoA-Konzentration am geringsten (Abb. III.1.4.b-1). Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Ergebnissen einer Studie, in der von einer Malonyl-CoA-resistenten CPT-1-Subfraktion in oxidativen Muskeln berichtet wird (KIM et al, 2002).

Die Malonyl-CoA-Konzentration in der Leber verringerte sich durch den Nahrungsentzug nicht signifikant (Abb. III.1.4.b-2). Dass trotz der hohen Malonyl-CoA Werte in den hepatischen Mitochondrien Fettsäuren oxidiert werden können, liegt möglicherweise in einer verminderten CPT-1-Sensitivität für Malonyl-CoA während einer längeren postabsorptiven Phase (DRYNAN et al, 1996).

Bei Wiederanfütterung kam es in der Leber der Wistar-Ratten zu einem hochsignifikanten Anstieg der Malonyl-CoA-Konzentration (Abb. III.1.4.b-2). Dieser Anstieg kann durch eine Insulin-vermittelte Aktivierung von ACC (CHIEN et al, 2000) erklärt werden.

Die LCACoA-Konzentration im glykolytischen LONG blieb trotz der beobachteten Dynamik von FFS und IMCL während der gesamten postabsorptiven Phase konstant (Tab III.1.4.c-1). LCACoA wurden als Bindeglied zwischen Insulinresistenz bei Obesitas und Diabetes identifiziert (COONEY et al, 2002). Sie sollen die Insulinsignalkaskade hemmen und dadurch direkt an der Pathogenese der Insulinresistenz beteiligt sein (Abb. I.1.3.a-2) (BODEN et al, 2002; SHULMAN, 2000). Der IMCL-Anstieg in Folge erhöhter FFS-Konzentrationen im Serum scheint somit ein protektiver Mechanismus zu sein, um eine intrazelluläre Akkumulation von LCACoA zu vermeiden.

In der Leber hingegen stieg die Gesamt-LCACoA-Konzentration postabsorptiv an (Tab. III.1.4.c-2). Dieser Anstieg kann Folge einer Aktivierung von PPAR- α im postabsorptiven Zustand (KERSTEN et al, 1999) sein. PPAR- α stimuliert unter anderem die Aktivität der Acyl-CoA-Synthetase (SCHOONJANS et al, 1995). Die Leber zeigte somit eine dem glykolytischen Muskel umgekehrte Dynamik: Während

im Muskel die LCACoA-Konzentration unverändert blieb, stieg IMCL deutlich an. In der Leber veränderte sich HepCL nicht, während die LCACoA-Konzentration postabsorptiv anstieg.

Palmitoleoyl-CoA zeigte eine konträre Dynamik: Die Konzentration dieser aktivierten Fettsäure sank postabsorptiv ab und stieg bei Wiederanfütterung deutlich an (Tab. III.1.4.c-2). Die postabsorptiv niedrige Konzentration von Palmitoleoyl-CoA kann sowohl durch bevorzugte Oxidation dieser Fettsäure als auch durch eine verminderte Expression der SCD verursacht worden sein. Die SCD katalysiert die Desaturierung von Palmitat und Stearat an der $\Delta 9$ -Position. Durch diese Reaktion entstehen Palmitoleinsäure und Ölsäure. Die Genexpression dieses Enzyms wird unter anderem durch Insulin stimuliert (NTAMBI, 1999). Interessanterweise scheint diese Regulation nur in der Leber, nicht aber in der Muskulatur aufzutreten.

IV.1.2 Insulinresistente ZDF-Ratten

Ziel dieser Studie war es, Unterschiede im postabsorptiven Lipidstoffwechsel zwischen insulinresistenten Individuen und ihren schlanken, insulinsensitiven Geschwistertieren aufzudecken.

Die 8 Wochen alte obese ZDF-Ratte befindet sich in einem prädiabetischen Zustand. Die Insulinwirkung ist bei diesen Tieren deutlich abgeschwächt. Allerdings sind die pankreatischen β -Zellen in der Lage, die Stoffwechselstörung durch vermehrte Insulinsekretion auszugleichen. Diese kompensatorische Maßnahme spiegelt sich in den Blutparametern wider: Die Tiere sind hyperinsulinämisch und annähernd normoglykämisch.

Während die Serumtriglyzeridspiegel bei den obesen ZDF-Ratten ebenfalls erhöht waren (Abb. III.2.2-3), lagen die FFS auf dem Niveau der schlanken Kontrollratten (Abb. III.2.2-4). Die antilipolytische Wirkung des Insulins auf das Fettgewebe ist in diesem Alter noch vorhanden und hält die Blutspiegel der FFS auf niedrigem Niveau. Die Hypertriglyzeridämie der obesen Tiere ist das Resultat einer Hyperphagie, die diese Ratten aufgrund ihres Leptin-Rezeptordefektes zeigen (ZUCKER, 1965 bei ZF-Ratten).

Hinsichtlich der Dynamik der metabolischen Serumparameter bei adipozytärer Lipolyse unterschieden sich die obesen ZDF-Ratten nicht von ihren schlanken Geschwistertieren. Allerdings traten die metabolischen Veränderungen bei den obesen Tieren tendenziell verzögert auf. Während sich die Serumparameter der

schlanken Ratten bereits nach 24 Stunden auf dem gleichen Niveau befanden wie am Ende der postabsorptiven Phase, war dieser „Endzustand“ bei den obesen Tieren erst nach längerer Nahrungskarenz erreicht. Besonders deutlich war dies beim Verlauf der Ketonkörperspiegel (Abb. III.2.2-5). Das Endprodukt der β -Oxidation in der Leber tritt im Blut der obesen Tiere zeitlich verzögert auf. Diese Beobachtungen stützen die Theorie einer metabolischen Inflexibilität adipöser Individuen (KELLEY, 2002). Obese Menschen sind demnach nicht in der Lage, ihre β -Oxidationsrate adäquat an veränderte Stoffwechselsituationen anzupassen.

Der IMCL-Gehalt der insulinresistenten obesen ZDF-Ratten war gegenüber den schlanken Tieren im gefütterten Zustand in allen untersuchten Skelettmuskeln erhöht (Abb. III.2.3.a-1). Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit der beschriebenen Korrelation zwischen dem IMCL-Gehalt und Insulinresistenz (KUHLMANN, 2002; BRECHTEL et al, 1999; JACOB et al, 1999; KRSSAK et al, 1999; PERSEGHIN et al, 1999).

Während der adipozytären Lipolyse konnte, entsprechend der Beobachtungen bei den insulin sensitiven Wistar-Ratten, ein Anstieg des IMCL im glykolytischen TIB und dem intermediären EDL, nicht jedoch im oxidativen SOL beobachtet werden (Abb. III.2.3.a-1). Die schlanken Tiere zeigten mit fortschreitender Dauer der Nahrungskarenz ein tendenzielles Absinken von IMCL (Abb. III.2.3.a-1). Dieses Absinken kann auf die geringen Fettreserven dieser Tiere zurückzuführen sein. Für diese These sprechen neben dem schlanken Phänotyp dieser Tiere auch die am dritten Tag der Nahrungskarenz sinkende Konzentration der FFS im Serum und die sinkenden LCACoA-Konzentrationen im LONG und in der Leber. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass überschüssige FFS aus dem Serum in Myozyten zwischengelagert werden (siehe Kapitel IV.1.1). Eine abnehmende FFS-Freisetzung bei niedrigen Seruminsulinspiegeln führte bei den schlanken ZDF-Ratten zu sinkenden IMCL-Konzentrationen.

Bei den obesen ZDF-Ratten wurden in den glykolytischen Muskeln während der postabsorptiven Phase sehr hohe IMCL-Werte erreicht (Abb. III.2.3.a-1). Diese Resultate lassen unterschiedliche Interpretationsmöglichkeiten zu: Trotz ähnlicher FFS-Spiegel im Serum wird bei den obesen Tieren deutlich mehr Lipid in den Muskelzellen gespeichert. Da sich die von der Skelettmuskelzelle aufgenommenen Lipide aus den FFS der adipozytären Lipolyse und den Fettsäuren der Triglyzeride zusammensetzen, deren Konzentration bei den obesen Tieren deutlich erhöht sind,

ist der Skelettmuskel der obesen Ratten einer deutlich höheren intravasalen Lipidkonzentration ausgesetzt. Möglicherweise ist auch die absolute Menge an FFS, die bei diesen Tieren postabsorptiv freigesetzt wird, aufgrund der größeren Fettdepots größer als bei den schlanken Ratten. Diese FFS werden konsequent vom Skelettmuskel aufgenommen und bewirken somit keine Erhöhung der intravasalen Fettsäurekonzentration. Hier ist die Kapazität zur Oxidation jedoch erschöpft. Dies führt zur Akkumulation in Form von IMCL. Diese Hypothese wird gestützt durch die postabsorptive Erhöhung von HepCL bei den obesen Ratten (Abb. III.2.3.b-1). Aufgrund der in großer Menge anflutenden Lipide ist die Kapazität zur Lipidoxidation oder Abgabe als VLDL-Partikel erschöpft, so dass eine Speicherung in der Leber erfolgt (LEWIS et al, 2002). Als weiterer Faktor kommt hinzu, dass die postabsorptive β -Oxidationsrate in der Muskulatur obeser Individuen vermindert ist (RAVUSSIN et al, 2002; KELLEY et al, 1999). Dies führt ebenfalls zu einer verstärkten Speicherung der Lipide in nicht-adipozytären Geweben. SIMONEAU et al (1999) beschreiben bei reduzierter oxidativer Kapazität eine ähnliche, wenn nicht sogar verstärkte Kapazität des Skelettmuskels zur Aufnahme von Fettsäuren bei obesen Menschen. KIM et al (2001) beschreiben bei Mäusen einen Zusammenhang zwischen erhöhter Expression der LPL und Insulinresistenz. Auch bei diesem Modell liegt ein Missverhältnis zwischen Lipidaufnahme und Lipidoxidation vor. Und auch hier ist dieses Missverhältnis mit Insulinresistenz verbunden.

Somit sind die postabsorptiv extrem hohen IMCL-Werte und auch der HepCL-Anstieg möglicherweise Resultate aus verschiedenen Vorgängen: Zum einen führt das erhöhte intravasale Lipidangebot bei den obesen Ratten zu einer vermehrten Aufnahme von Lipiden in die Muskelzelle. Zum anderen ist bei diesen Tieren die Kapazität zur β -Oxidation vermindert.

Hinsichtlich Malonyl-CoA war in den glykolytischen Muskeln der schlanken Ratten während der postabsorptiven Phase eine Dynamik zu erkennen (Abb. III.2.4.b-1). Im oxidativen SOL hingegen blieb, wie schon bei den Wistar-Ratten beobachtet, diese Dynamik aus. Auch bei den ZDF-Ratten scheint im SOL ein Malonyl-CoA-unabhängiger Weg der Fettsäureoxidation zu existieren. In wie weit die beobachtete Dynamik jedoch einen Rückschluss auf die CPT-1-Aktivität zulässt, kann in diesem Zusammenhang aufgrund der beschriebenen Kompartimentalisierung von Malonyl-CoA nur vermutet werden. In den glykolytischen Muskeln war die postabsorptive Absenkung bei den obesen Tieren nicht so deutlich

ausgeprägt. Die postabsorptive mitochondriale β -Oxidation scheint somit bei diesen Tieren durch Malonyl-CoA gehemmt zu sein. Da die Malonyl-CoA-Konzentrationen der beiden untersuchten Gruppen sich im gefütterten Zustand nur geringgradig unterschieden, könnte die verminderte postabsorptive Absenkung ein weiterer Hinweis für die metabolische Inflexibilität der insulinresistenten Tiere sein. Bei guter Energieversorgung der Zelle wird zytosolisches Citrat zu Oxalacetat und Acetyl-CoA gespalten. Acetyl-CoA kann dann zu Malonyl-CoA umgesetzt werden. Somit wird bei ausreichender Energieversorgung der Zelle die Lipidoxidation über hohe Malonyl-CoA-Spiegel gehemmt. In Energiemangelzuständen, welche durch einen Anstieg des Adenosinmonophosphat (AMP) / ATP – Verhältnisses gekennzeichnet sind, wird die ACC durch eine erhöhte Aktivität der AMPK gehemmt (RUDERMAN et al, 2003). Die obesen Tiere scheinen sich, eventuell durch eine Reduktion ihres Energieverbrauches, in einer besseren energetischen Situation zu befinden. Dies könnte die in der postabsorptiven Phase höheren Malonyl-CoA-Konzentrationen erklären.

Die Malonyl-CoA-Konzentrationen in der Leber der obesen Tiere waren sowohl im gefütterten Zustand als auch in der postabsorptiven Phase gegenüber den schlanken Ratten hochsignifikant erhöht (Abb. III.2.4.b-2). Dies spricht für eine, im Vergleich mit den schlanken Tieren, deutliche Hemmung der Fettsäureoxidation. Welche Rolle dabei die verminderte CPT-1-Sensitivität gegenüber Malonyl-CoA bei einer längeren postabsorptiven Phase spielt, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die verzögert ansteigenden Ketonkörperspiegel sprechen jedoch für eine Sensitivitätsverminderung mit fortschreitender Dauer der postabsorptiven Phase, die eine Erhöhung der β -Oxidationsrate erst verspätet möglich macht.

Die LCACoA-Konzentration im LONG der obesen Ratten war gegenüber den schlanken Tieren im gesamten Versuchszeitraum signifikant erhöht (Tab. III.2.4.c-1). Hohe LCACoA-Konzentrationen im Zusammenhang mit Insulinresistenz werden in der Literatur beschrieben (HEGARTY et al, 2003; ELLIS et al, 2000; OAKES et al, 1997; CHEN et al, 1992). Eine Kausalität zwischen erhöhter LCACoA-Konzentrationen und Insulinresistenz wird über verschiedene Mechanismen postuliert (Abb. I.1.3.a-2): In Versuchen mit Muskelhomogenaten wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung der HK durch LCACoA beobachtet (THOMPSON et al, 2000). Eine verminderte HK-Aktivität konnte bei den obesen Tieren bei den Untersuchungen zur oxidativen Kapazität der verschiedenen

Skelettmuskeltypen beobachtet werden (siehe Anhang, Kapitel VIII.1.a). Diese führt zur verminderten intrazellulären Konzentration von G6P, und somit zu einer Verminderung von Glukoseoxidation und Glykogenbildung. Letztendlich führt eine Hemmung der HK zu einer Verminderung der insulinunabhängigen Glukoseaufnahme und damit zu erhöhten intravasalen Glukosespiegeln (RODEN et al, 1996).

Andere Mechanismen, über die LCACoA die Insulinwirkung beeinträchtigen sollen, laufen über eine Hemmung der Insulinsignalkaskade ab: Durch die Bildung von Ceramid hemmen LCACoA die Proteinkinase B (PKB) (SUMMERS et al, 1998). Direkt (HEGARTY et al, 2003) und über die Bildung von DAG (MCGARRY, 2002) wird die PKC stimuliert. Sowohl die Konzentration an DAG als auch an Ceramid ist bei obesen ZF-Ratten im Skelettmuskel erhöht (TURINSKY et al, 1990).

Da die DAG-Konzentration im Rahmen dieser Dissertation nicht bestimmt wurde, kann über die Wirkung von DAG auf die PKC in diesem Zusammenhang nur spekulativ diskutiert werden: Da in den glykolytischen Muskeln der obesen Tiere erhöhte IMCL-Level vorliegen, und die Synthese dieser Triglyzerid-Droplets über die Zwischenstufe DAG erfolgt, lässt diese Beobachtung den Schluss zu, dass damit auch die Konzentration an DAG erhöht ist. Weiterhin besteht ein dynamisches Gleichgewicht („fatty-acid cycling“, beschrieben für Adipozyten: COMMERFORD et al, 2000) zwischen Triglyzeridauf- und -abbau. Bei diesen Vorgängen entsteht ebenfalls DAG.

Ein Ausgangsstoff für die Bildung von Ceramid stellt Palmitoyl-CoA dar. Palmitoyl-CoA stimuliert, im Gegensatz zu ungesättigten Fettsäuren, die Bildung von Ceramid (CHAVEZ et al, 2003). Da die Konzentration dieser aktivierten Fettsäure bei den obesen Tieren ebenfalls erhöht ist, kann eine Hemmung der PKB durch gesteigerte Ceramid-Bildung vermutet werden.

Palmitoleoyl-CoA war bei den obesen Tieren signifikant gegenüber den schlanken Ratten erhöht (Tab. III.2.4.c-1). Dies ist möglicherweise Ausdruck einer erhöhten SCD-Expression, die für diese Tiere beschrieben ist (VOSS et al, 2003; siehe auch Kapitel IV.2).

Trotz der Dynamik von IMCL und FFS stieg die LCACoA-Konzentration im LONG bei den schlanken Tieren zu Beginn der postabsorptiven Phase nur geringgradig an (Tab. III.2.4.c-1). Diese Beobachtung ist konsistent mit den Resultaten der Studie bei den Wistar-Ratten. Die am dritten Tag der Nahrungskarenz

absinkende LCACoA-Konzentration lässt sich im Zusammenhang mit den sinkenden Fettreserven dieser Tiere erklären. Bei den obesen Tieren konnte hingegen ein deutlicher Anstieg der LCACoA-Konzentration während der postabsorptiven Phase beobachtet werden. Dieser Anstieg deutet auf ein Missverhältnis zwischen Lipidaufnahme einerseits und der Verstoffwechslung dieser Lipide andererseits hin. Die sehr hohen IMCL-Werte der obesen Tiere legen die Vermutung nahe, dass nicht die Triglyzeridbildung, sondern vielmehr der katabole Lipidstoffwechsel gestört ist. Während insulinresistente Tiere in der Lage sind, über vermehrte Bildung von IMCL eine Erhöhung der intrazellulären LCACoA-Konzentration zu verhindern, führt die Erhöhung der intravasalen FFS-Konzentration bei den insulinresistenten Tieren trotz Bildung von IMCL zu einer Ansammlung von LCACoA in der Muskelzelle.

Die LCACoA-Konzentrationen in den Lebern obeser Ratten unterschieden sich nicht von denen schlanker Tiere (Tab. III.2.4.c-2). Möglicherweise ist die Leber in der Lage, die FFS direkt zu verestern, was sich in hohen HepCL-Gehalten widerspiegelt. Eine andere Möglichkeit die LCACoA-Konzentration zu verringern, die Beschleunigung der Fettsäureoxidation, scheint aufgrund der bei den obesen Tieren erhöhten Malonyl-CoA-Spiegel nicht wahrscheinlich.

Die unter postabsorptiven Bedingungen gegensätzlichen Veränderungen in Leber und Muskulatur, welche bei der Wistar-Ratte beobachtet werden konnten, waren bei den schlanken ZDF-Ratten ebenfalls zu sehen. Die obesen Tiere zeigten dagegen einen Anstieg aller Parameter: IMCL, HepCL und LCACoA in Leber und Skelettmuskel waren postabsorptiv erhöht.

Palmitoleoyl-CoA war gegenüber den schlanken Ratten signifikant erhöht (Tab. III.2.4.c-2), was ebenso wie in der Muskulatur für eine erhöhte SCD-Aktivität spricht. Die Konzentrationen von Linoleoyl-CoA und Arachidonoyl-CoA lagen in ähnlichem Konzentrationsbereich wie bei den schlanken Tieren. Da die Gesamt-LCACoA-Konzentration bei den obesen Tieren jedoch deutlich höher lag als bei den schlanken Ratten, ist der Anteil von Linoleoyl-CoA und Arachidonoyl-CoA bei den obesen Tieren geringer. Dies kann Ausdruck einer erhöhten $\Delta 6$ - und verminderten $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität bei obesen Individuen (VESSBY et al, 2002) sein.

Postabsorptiv erhöhte sich die hepatische LCACoA-Konzentration, mit Ausnahme von Palmitoleoyl-CoA, bei beiden untersuchten Tiergruppen. Diese Dynamik ist konsistent mit den Beobachtungen bei der Wistar-Ratte (siehe Kapitel IV.1.1).

IV.1.3 Diabetische ZDF-Ratten

Im Alter von 16 Wochen war der Diabetes bei den obesen ZDF-Ratten manifest. Dies spiegelte sich in einer deutlichen postprandialen und postabsorptiven Hyperglykämie wider (Abb. III.3.2-1). Die pankreatischen β -Zellen sind in diesem Alter bereits partiell lipoapoptotisch (UNGER, 1995) zugrunde gegangen. Die Seruminsulinspiegel der 16 Wochen alten obesen ZDF-Ratten waren dementsprechend gegenüber den 8 Wochen alten Tieren erniedrigt (Abb. III.3.2-2). Den pankreatischen β -Zellen kommt somit die entscheidende Rolle beim Ausbruch des Diabetes zu: Erst wenn ihre Insulinsekretion nicht mehr ausreicht, um eine adäquate Wirkung in den peripheren Organen zu erzielen, kommt es zur Entgleisung des Glukosestoffwechsels und somit zum Diabetes. Die durch das Insulindefizit verursachte verminderte antilipolytische Wirkung des Insulins beeinflusst auch den Lipidstoffwechsel: Sie bewirkt postprandial eine Erhöhung der aus dem Fettgewebe freigesetzten FFS im Serum und konsekutiv auch eine Erhöhung der Ketonkörperpiegel (siehe auch: Abb. III.3.2-4 und -5).

Bei den diabetischen Ratten überlagern sich somit mehrere, gleichzeitig ablaufende Prozesse: Zum einen haben die Tiere aufgrund ihrer Insulinresistenz eine verminderte Fähigkeit, auf veränderte Stoffwechselbedingungen zu reagieren. Zum anderen befinden sie sich durch den Diabetes mit Glukosurie und erhöhter adipozytärer Lipolyserate in einer katabolen Stoffwechsellage. Bei diesen Tieren wurde nun durch den Entzug der Nahrung ein zusätzlicher Reiz zur adipozytären Lipolyse gesetzt.

Die katabole Stoffwechsellage und die verminderte metabolische Flexibilität spiegelten sich in der Dynamik von IMCL während der postabsorptiven Phase wider: Während im Alter von 8 Wochen postabsorptiv noch sehr hohe IMCL-Werte erreicht wurden, war eine derartige Steigerung der adipozytären Lipolyse bei den diabetischen Tieren offenbar nicht mehr möglich (Abb. III.3.3.a-1). Auch der postabsorptive Anstieg der FFS (Abb. III.3.2-4) fiel bei diesen Tieren moderater aus.

HepCL lag während der gesamten Versuchsdauer deutlich höher als bei den schlanken Tieren und zeigte keinerlei Dynamik (Abb. III.3.3.b-1). Bei den diabetischen Tieren wird die protektive Funktion der Leber gegen exzessive Lipidbelastung (GIBBONS et al, 2000) genutzt: Die chronisch erhöhten FFS werden aus dem Blut entfernt und in der Leber als Triglyzeride zwischengespeichert. Dies resultiert allerdings in chronisch erhöhtem Lipidgehalt der Leber.

Malonyl-CoA lag in den glykolytischen Muskeln der diabetischen Tiere niedriger als bei den schlanken Ratten (Abb. III.3.4.b-1). Dies ist ein Zeichen für die bevorzugte Nutzung von Lipid als Substrat zur Energiegewinnung. Entsprechend der geringen Änderungen der FFS- und IMCL-Konzentration zeigte Malonyl-CoA keinerlei Dynamik im Verlauf der postabsorptiven Phase (Abb. III.3.4.b-1).

Die LCACoA-Konzentration im LONG der 16 Wochen alten Tiere lag, analog zum IMCL, sowohl bei den schlanken als auch bei den obesen Tieren niedriger als bei den 8 Wochen alten Ratten (Tab. III.2.4.c-1 und Tab. III.3.4.c-1). Bei den schlanken Ratten sind diese Resultate als Phänomen des Alters zu werten. Die Tiere befinden sich mit 16 Wochen nicht mehr im Wachstum und haben daher einen geringeren Energiebedarf. Bei den obesen Tieren trägt die katabole, diabetische Stoffwechsellage zur Senkung der intramuskulären Lipide (IMCL und LCACoA) bei. Die Dynamik und die Zusammensetzung der LCACoA entsprachen weitestgehend den Ergebnissen aus der Studie mit den 8 Wochen alten Tieren (Tab. III.3.4.c-1).

In der Leber zeigten die diabetischen Ratten ähnliche LCACoA-Spiegel wie die jüngeren Tiere (Tab. III.2.4.c-2 und Tab. III.3.4.c-2). Allerdings fehlt den alten Ratten der postabsorptive Konzentrationsanstieg, der sowohl bei den 8 Wochen alten Tieren als auch bei den schlanken Ratten im Alter von 16 Wochen zu sehen war. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass bei den diabetischen Tieren in der postabsorptiven Phase HepCL und Malonyl-CoA konstant blieben und die FFS und Ketonkörper nur moderat anstiegen. Auch das Absinken der Serumtriglyzeride trat bei diesen Tieren erst am dritten Tag der Nahrungskarenz ein.

Die diabetischen Tiere zeigten hinsichtlich der Lipidparameter nur eine sehr schwache Reaktion auf die postabsorptiv veränderten nutritiven Bedingungen.

IV.1.4 Mit Antidiabetika behandelte ZDF-Ratten

Diese Studie wurde durchgeführt, um einen neuen PPAR- α -Agonisten im Vergleich mit Rosiglitazon und Metformin bei veränderter Stoffwechselsituation pharmakologisch zu charakterisieren.

Dazu wurden die Tiere ab der 6. Lebenswoche mit dem PPAR- α -Agonisten, Rosiglitazon (PPAR- γ -Agonist) oder Metformin (Biguanid) behandelt (Studiendesign: Abb. II.3-c). Der Ausbruch des Diabetes konnte durch alle Behandlungsstrategien verhindert werden.

Während es infolge der Behandlung mit den Insulin-Sensitizern (PPAR-Agonisten) zur Normalisierung sowohl der gemessenen Serumparameter als auch von IMCL und HepCL kam, senkte Metformin lediglich die Blutglukose (Kapitel III.4.1 und Kapitel III.5.3). Die Wirkung von Insulin-Sensitizern auf die Lipidparameter und die intrazellulären Lipide ist umstritten. Während beim Menschen kein Einfluss von Rosiglitazon auf das IMCL beobachtet werden kann (MAYERSON et al, 2002), senkt diese Substanz bei der ZF-Ratte (HOCKINGS et al, 2003; JUCKER et al. 2003) und der ZDF-Ratte (KUHLMANN et al, 2003) den IMCL-Gehalt. Die Aktivierung von PPAR- α senkt bei Ratten, welche mit einer fettreichen Diät gefüttert wurden, den biochemisch bestimmten Triglyzeridgehalt des Muskels (YE et al, 2001).

Die Behandlung mit Rosiglitazon bewirkte eine verstärkte Zunahme des Körpergewichtes (Abb. III.4.1.b-1). Die Behandlung mit dem PPAR- α -Agonisten bewirkte hingegen eine Verringerung der Gewichtszunahme. Die in der Rosiglitazon-Gruppe aufgetretene Gewichtszunahme resultierte in einem gegenüber den unbehandelten Tieren um 1/3 erhöhten Körperfettanteil (Abb. III.4.2-1). Diese Entwicklung liegt im Wirkmechanismus des Präparates begründet: Glitazone bewirken primär eine verbesserte Insulinwirkung im Fettgewebe. Die Aktivierung von PPAR- γ durch Glitazone resultiert in einer verstärkten Adipozyten-Differenzierung (OKUNO et al, 1998). Es kommt zur Neubildung von Adipozyten aus Präadipozyten. Diese „jungen“ Adipozyten besitzen ein erhöhtes Potenzial zur Lipidspeicherung (DE SOUZA et al, 2001). Die Behandlung mit Rosiglitazon bewirkt so eine Zunahme der Fettsäureaufnahme in die Fettzelle (GUAN et al, 2002). Diese vermehrte Lipidspeicherung resultierte bei den behandelten Ratten in extremer Adipositas.

Im Gegensatz zu den mit Rosiglitazon behandelten Tieren war in der mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Gruppe eine gegenüber den Kontrollen verminderte Gewichtszunahme beobachtet worden (Abb. III.4.1.b-1). Auch dies lässt sich über den Wirkmechanismus der Substanz erklären. Während PPAR- γ primär im Fettgewebe exprimiert wird, findet sich PPAR- α vor allem in der Leber, aber auch in der Skelettmuskulatur (DESVERGENE et al, 1999). Dort findet eine Stimulierung der β -Oxidation statt (SEEDORF et al, 2001).

Somit bewirkt die Aktivierung beider PPAR's die Entfernung von Lipiden aus dem Blut: PPAR- α durch eine erhöhte β -Oxidationsrate und PPAR- γ durch Aufnahme

von Lipiden in die Adipozyten. Beide Wirkmechanismen resultieren in einer verbesserten Insulinwirkung durch Verminderung der ektopischen Lipidakkumulation.

Der Wirkmechanismus von Metformin ist nicht vollständig aufgeklärt. Die Normalisierung der Blutglukose erfolgt wahrscheinlich durch Reduktion der hepatischen Glukoseproduktion (HUNDAL et al, 2000). Eine Verbesserung der Insulinwirkung durch Metformin wird diskutiert (CUSI et al, 1998; CUSI et al, 1996). Im Rahmen dieser Dissertation konnte ein solcher Effekt nicht beobachtet werden. Dies wird durch die hohen Insulinspiegel über die gesamte Behandlungsdauer deutlich (Abb. III.4.1.c-3).

Aufgrund der Ergebnisse, welche durch die Metformin-Behandlung der ZDF-Ratten erzielt wurden, kann vermutet werden, dass Metformin die Apoptose der β -Zellen des Pankreas verhindert. Diese protektive Wirkung auf die β -Zellen ist aufgrund der postulierten Pathogenese der β -Zelldegeneration verwunderlich: Es wird vermutet, dass die vermehrte Lipidbelastung eine toxische Wirkung hat, was die β -Zellen in die Apoptose treibt (UNGER, 1995). Metformin hatte im Rahmen dieser Studie jedoch keinen Einfluss auf die Lipidparameter (Abb. III.4.1.c-4 und Abb. III.4.1.c-5). Eine protektive Wirkung von Metformin auf die pankreatischen β -Zellen bei der ZDF-Ratte wird auch von SREENAN et al (1996) beschrieben. In dieser Studie wurde allerdings auch eine Wirkung auf die Insulinsekretion sowie die Lipidparameter beobachtet. Die Unterschiede sind möglicherweise mit der von Sreenan verwendeten höheren Metformin-Dosis zu erklären. Aufgrund der erhöhten Serumlipide in der Metformin-Gruppe scheint die Lipotoxizität nicht primär für den Untergang der β -Zellen verantwortlich zu sein. POITOUT et al (2002) postulieren, dass die β -Zellen nicht durch die Lipidbelastung, sondern durch hohe Blutglukosespiegel zugrunde gehen. Bei obesen ZDF-Ratten führt eine durch pharmakologische Intervention herbeigeführte Absenkung der Serumlipide nicht zu einer Verminderung des Triglyzeridgehaltes in der β -Zelle. Dies ist dagegen mit einer selektiven Senkung der Blutglukose, ohne Beeinflussung der Serumtriglyzeride zu erreichen (HARMON et al, 2001). Somit wäre eine protektive Wirkung von Metformin auf die β -Zelle durch konsequente Senkung der Blutglukose, möglich.

Postabsorptiv verhielten sich alle behandelten Tiere hinsichtlich der Parameter des Glukosestoffwechsels entsprechend den schlanken Kontrollratten (Abb. III.5.2-

1). Die antidiabetische Therapie war somit auch unter veränderten Stoffwechselbedingungen erfolgreich.

IV.1.4.a Postabsorptive adipozytäre Lipolyse unter Behandlung mit einem PPAR- α -Agonisten

Eine Aktivierung von PPAR- α bewirkt bei Nagetieren, nicht aber beim Menschen, eine Proliferation von Peroxisomen in der Leber (DESVERGNE et al, 1999). Die Steigerung der β -Oxidation durch PPAR- α -Aktivierung ist bei Nagetieren Ergebnis einer gesteigerten mitochondrialen, peroxisomalen und mikrosomalen Lipidoxidation (REDDY, 2001_a). Unter postabsorptiven Bedingungen kommt es in der Leber zu einer physiologischen Stimulation von PPAR- α (KERSTEN et al, 1999). Somit ergibt sich ein Synergieeffekt aus den postabsorptiven Stoffwechselbedingungen und der Behandlung.

Trotz verbesserter Lipidoxidation war der Körperfettanteil der behandelten Tiere gegenüber den obesen Kontrolltieren erhöht (Abb. III.4.2-1). Die obesen Kontrolltiere befinden sich jedoch aufgrund des Diabetes bereits in einer katabolen Stoffwechsellage. Dies erklärt den vergleichsweise geringen Körperfettanteil dieser Tiere.

Die postabsorptiven FFS-Spiegel dieser Tiere entsprachen denen der obesen Kontrollen (Abb. III.5.2-4). Allerdings kam es postabsorptiv zu einem Anstieg der Triglyzeride (Abb. III.5.2-3), während bei den Kontrolltieren ein Absinken der Triglyzeridspiegel im Serum beobachtet werden konnte. Dieser Anstieg war begleitet von sehr hohen postabsorptiven HepCL-Spiegeln (Abb. III.5.3.b-1) und einem deutlichen Anstieg des IMCL in allen untersuchten Muskelfasertypen (Abb. III.5.3.a-1 bis -3). Auch bei diesen Tieren war der Anstieg der Ketonkörperspiegel verzögert (Abb. III.5.2-5). Auch die Behandlung mit einem PPAR- α -Agonisten scheint dementsprechend nicht zu einer verbesserten metabolischen Flexibilität hinsichtlich der β -Oxidation zu führen, so dass die lipolytisch freigesetzten Fettsäuren zunächst in Muskulatur und Leber zwischengespeichert, beziehungsweise von der Leber als VLDL abgegeben werden. Der sofortige Anstieg von IMCL, HepCL und der Triglyzeride könnte ein Hinweis auf einen derartigen Mechanismus sein.

Die, vor allem im Alter von 16 Wochen außerordentlich hohen Ketonkörperspiegel sind vermutlich Ausdruck der peroxisomalen β - und der

mikrosomalen ω -Oxidation. Aufgrund der extremen Peroxisomenproliferation bei diesen Tieren scheint die peroxisomale β -Oxidation der quantitativ bedeutendere Weg zu sein. Bei der peroxisomalen β -Oxidation findet eine Verkürzung von sehr langkettigen ($> C_{20}$) und langkettigen ($C_{14} - C_{20}$) Fettsäuren statt (REDDY et al, 2001_b). Das dabei abgespaltene Acetyl-CoA kann in die Mitochondrien diffundieren, wo es entweder im Krebs-Zyklus oxidiert, oder in Ketonkörper umgewandelt wird. Acetyl-CoA kann auch im Zytosol zu Acetoacetyl-CoA synthetisiert werden. Aus zytosolischem Acetyl-CoA kann außerdem über die ACC Malonyl-CoA gebildet werden, was wiederum die mitochondriale β -Oxidation hemmt. Bei den Tieren dieser Studie wurde, diese Hypothese unterstützend, eine extrem hohe hepatische Malonyl-CoA-Konzentration festgestellt. So scheint die Aktivierung von PPAR- α bei der Ratte paradoxerweise eine Hemmung der mitochondrialen β -Oxidation zu bewirken. Beim Menschen ist diese Hemmung aufgrund der nicht vorhandenen Peroxisomenproliferation nicht zu erwarten. Es wäre vielmehr aufgrund des Synergieeffektes aus Behandlung und physiologischen Regulationsmechanismen mit einer erhöhten mitochondrialen β -Oxidationsrate zu rechnen.

Der extreme Anstieg der Ketonkörperspiegel im Blut war vor allem auf den Anstieg von Acetoacetat zurückzuführen. Die Konzentration von HO-Butyrat lag dagegen im gleichen Bereich wie bei den anderen untersuchten Gruppen (Abb. III.5.2-6). Auch dies kann als Hinweis auf eine vermehrte peroxisomale Lipidoxidation gewertet werden: Durch peroxisomale β -Oxidation (Abb. IV.1.4.a-1) im Zytosol entstandenes Acetoacetat kann nicht in HO-Butyrat umgewandelt werden, da diese Reaktion ausschließlich in den Mitochondrien stattfindet. Eine weitere mögliche Erklärung für das veränderte Verhältnis von Acetoacetat in HO-Butyrat ist ein Mangel an Reduktionsäquivalenten (Abb. IV.1.4.a-1): Für die in den Mitochondrien stattfindende Umwandlung von Acetoacetat in HO-Butyrat wird $NADH+H^+$ benötigt. In den Mitochondrien entsteht dieses bei der β -Oxidation. Da die mitochondriale β -Oxidation durch Malonyl-CoA gehemmt ist, Acetyl-CoA jedoch durch die peroxisomale β -Oxidation vermehrt in die Mitochondrien gelangt, entsteht dort ein Mangel an Reduktionsäquivalenten. Aufgrund der PPAR- α -stimulierten Ketogenese (MEERTENS et al, 1998) wird das Acetyl-CoA der peroxisomalen β -Oxidation bevorzugt zu Acetoacetat umgewandelt. Die weitere Umsetzung zu HO-Butyrat ist

jedoch gestört, was sich in dem veränderten Verhältnis von Acetoacetat zu HO-Butyrat zeigt.

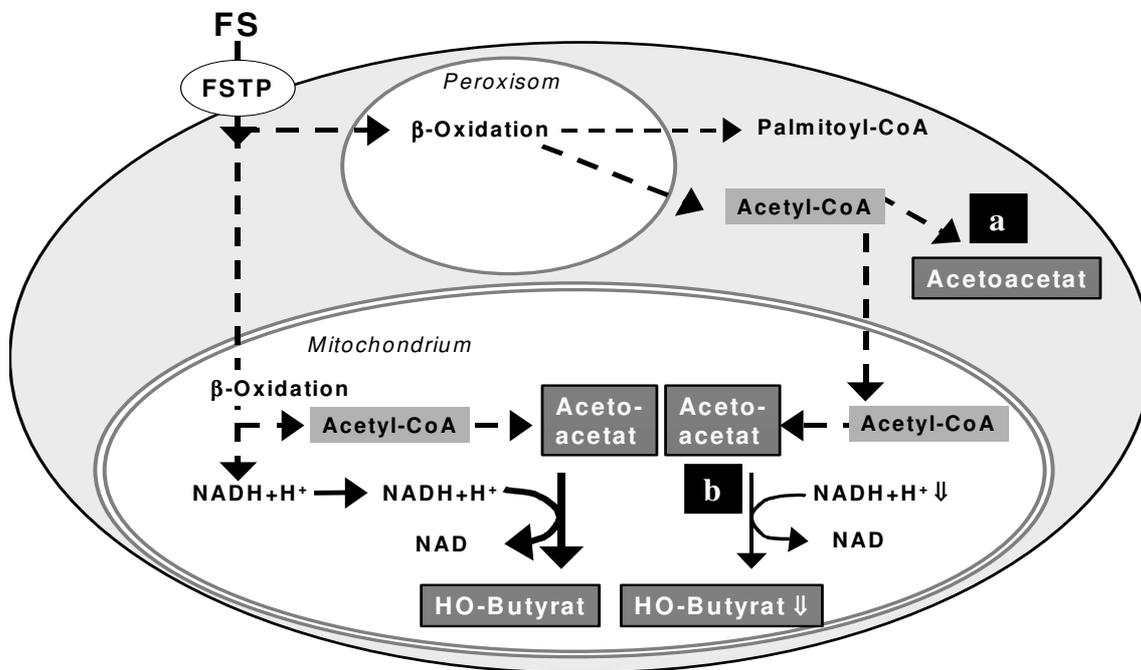


Abb. IV.1.4.a-1 Hypothesen zur Ketogenese bei Peroxisomenproliferation

- a** bei der peroxisomalen β -Oxidation entstandenes Acetyl-CoA wird im Zytosol zu Acetoacetat umgewandelt.
- b** bei der peroxisomalen β -Oxidation entstandenes Acetyl-CoA wird in den Mitochondrien zu Acetoacetat umgewandelt. Eine weitere Umsetzung zu HO-Butyrat ist aufgrund des Mangels an $\text{NADH}+\text{H}^+$ nicht möglich

FS: Fettsäure

FSTP: Fettsäuretransportprotein

Eine weitere Wirkung von PPAR- α ist die Aktivierung der Acyl-CoA-Synthetase in der Leber (SCHOONJANS et al, 1995). Dies ist konsistent mit der erhöhten LCACoA-Konzentration in der Leber der mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tiere (Tab. III.4.3.b-2). Die extrem hohen Konzentrationen, die in dieser Gruppe gemessen wurden, führen möglicherweise zu einer Reveresterung der Fettsäuren. Diese werden sowohl als VLDL abgegeben als auch in Form von HepCL gespeichert. Dies erklärt die extrem hohen HepCL-Spiegel und die ansteigenden Triglyzeridlevel in der postabsorptiven Phase.

In der Muskulatur war die LCACoA-Konzentration gegenüber den übrigen obesen Gruppen erniedrigt (Tab. III.4.3.b-1). Da IMCL bereits am ersten Tag der postabsorptiven Phase sehr stark anstieg, spricht dies für eine schnelle und effektive

Lipidspeicherung in Folge dieser Behandlungsmethode. Im Zusammenhang mit niedrigen IMCL-Werten im gefütterten Zustand ist diese effektive Vermeidung hoher LCACoA-Konzentrationen möglicherweise mitverantwortlich für eine verbesserte Insulinsensitivität im Skelettmuskel.

Bei Behandlung mit dem PPAR- α -Agonisten kann aufgrund der postabsorptiv extrem hohen intrazellulären Lipide sowie der hohen Ketonkörper Spiegel ein, gegenüber unbehandelten Tieren, erhöhter Fettsäureflux vermutet werden. Dieser spiegelt sich aufgrund der sofortigen Aufnahme in die Zelle jedoch nicht in drastisch erhöhten FFS-Spiegeln wider. Um eine abschließende Beurteilung über die bei Behandlung mit dem PPAR- α -Agonisten postabsorptiv auftretende Lipidmenge treffen zu können, sind Studien über den Fettsäureflux notwendig.

IV.1.4.b Postabsorptive adipozytäre Lipolyse unter Behandlung mit Rosiglitazon

Die FFS stiegen bei diesen Tieren postabsorptiv auf sehr hohe Werte an (Abb. III.5.2-4). FFS erscheinen im Serum exklusiv als Ausdruck adipozytärer Lipolyse. Untersuchungen an isolierten Adipozyten zeigen jedoch, dass unter Behandlung mit Glitazonen die Lipolyserate nach Stimulierung mit direkten Sympathomimetika gegenüber unbehandelten Zellen vermindert ist (GUAN et al, 2002). Diese hohen FFS-Spiegel können daher nur mit der großen Adipozytenzahl der extrem adipösen Tiere erklärt werden. Die deutlich erhöhte Fettmasse dieser Tiere maskiert so möglicherweise die aufgrund der Rosiglitazon-Behandlung reduzierte Lipolyserate.

IMCL wurde bei diesen Tieren nicht nur in den glykolytischen Muskeln, sondern auch im SOL abgelagert (Abb. III.5.3.a-3). Möglicherweise ist dies Resultat einer erhöhten Fettsäurekonzentration im Serum.

Auch hier müssten für eine abschließende Beurteilung über die postabsorptiv auftretende Lipidmenge Studien über den Fettsäureflux durchgeführt werden.

Bei den mit Rosiglitazon behandelten Tieren stiegen, wie auch schon bei den mit dem PPAR- α -Agonisten behandelten Tieren, die Triglyzeridspiegel im Serum postabsorptiv an (Abb. III.5.2-3). Diese erhöhten Triglyzeridspiegel können entweder durch eine erhöhte VLDL-Sekretionsrate oder aber durch verminderte Aufnahme der Triglyzeride in die peripheren Gewebe entstehen. Die sehr stark erhöhten FFS machen eine vermehrte Reveresterung in der Leber wahrscheinlich. Eine weitere Möglichkeit, die verzögerte Aufnahme in der Peripherie, scheint ebenfalls nicht ausgeschlossen: Die Serumspiegel von FFS und Triglyzeriden haben bereits am

ersten Tag ihr Maximum erreicht, die Akkumulation in Form von IMCL ist jedoch verzögert. Weiterhin werden Lipide im Blut, bedingt durch den Wirkmechanismus von Rosiglitazon, normalerweise direkt im Fettgewebe gespeichert, so dass die mLPL eventuell bei diesen Tieren nur vermindert aktiv ist.

Die Ketonkörperspiegel steigen, entsprechend der obesen Kontrollgruppe zeitlich verzögert an (Abb. III.5.2-5). Eine Behandlung mit Rosiglitazon scheint somit keine Verbesserung der metabolischen Inflexibilität zu bewirken. Möglicherweise ist der, gemessen an dem deutlichen Anstieg der FFS, relativ moderate Anstieg der Ketonkörper jedoch darüber hinaus auch als Folge der Rosiglitazon-Behandlung zu sehen: Die PPAR- γ -Aktivierung bewirkt in der Leber eine Erhöhung des anabolen Lipidstoffwechsels. Diese Mechanismen, eine verminderte Ketogenese bei gleichzeitig hohem Fettsäurespiegel im Serum führen zu einer vermehrten hepatischen Triglyzeridsynthese. Diese resultiert in erhöhten Serumtriglyzeridspiegeln und zu einer Speicherung als HepCL.

IV.1.4.c Postabsorptive adipozytäre Lipolyse unter Behandlung mit Metformin

Auch in der postabsorptiven Phase entsprachen die gemessenen Parameter der mit Metformin behandelten Tiere, mit Ausnahme der Blutglukose, in Verlauf und Konzentration den insulinresistenten Kontrolltieren (Abb. III.5.2-1).

Metformin scheint gemäß diesen Untersuchungen keinen Einfluss auf die Insulinsensitivität zu haben, sondern lediglich eine Verbesserung der Blutglukosehomöostase zu bewirken.

Dies steht im Widerspruch zu Untersuchungen, welche in vitro eine Steigerung der Fettsäureoxidation über eine Aktivierung der AMPK zeigen (ZHOU et al, 2001). Die Aktivierung der AMPK führt neben der Stimulation der Fettsäureoxidation auch zu einer verbesserten muskulären Glukoseaufnahme durch Stimulierung der Expression von GLUT4. Damit sollte Metformin einen insulinsensitivierenden Effekt und auch eine deutliche Senkung von IMCL zur Folge haben. Dies konnte jedoch bei den durchgeführten Studien nicht gezeigt werden. Insulinsensitivierende Wirkungen von Metformin sind mehrfach beschrieben. Veröffentlichungen über die insulinstimulierte Glukoseaufnahme reichen jedoch von einer 0 bis 40%igen Verbesserung unter Metformintherapie (CUSI et al, 1998).

IV.2 Rolle der SCD

Die Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD) wird in der Literatur als mögliches therapeutisches Zielprotein (Target) diskutiert.

Das Enzym katalysiert das Einfügen einer Doppelbindung an der $\Delta 9$ -Position einer Fettsäure. Dies resultiert in der Katalyse folgender Reaktionen:



Bei den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten LCACoA-Analysen wurden bei den obesen Ratten wiederholt erhöhte Konzentrationen an Palmitoleoyl-CoA gemessen. Daher soll hier auf die metabolische Funktion des Enzyms, welche obige Umsetzung katalysiert, näher eingegangen werden.

Die SCD-Aktivität in verschiedenen Geweben korreliert bei obesen Pima-Indianern (Skelettmuskel) (PAN et al, 1995), mit Adipositas. Eine entsprechende Korrelation konnte auch bei obesen ZF-Ratten (Fettgewebe) (JONES et al, 1996) und ob/ob-Mäusen (obese/obese) (Leber und Fettgewebe) (ENSER, 1975) nachgewiesen werden. Bei obesen, prädiabetischen ZDF-Ratten konnte eine erhöhte Expression des SCD-Genes im Skelettmuskulatur nachgewiesen werden. Diese Regulierung auf Genexpressionsebene resultierte in deutlich erhöhten Gewebsspiegeln an Palmitoleoyl-CoA (VOSS et al, 2003).

Kreuzungstiere aus der ob/ob-Maus und SCD-1-defizienten Mäusen (Asebia (ab^J/ab^J)) zeigen eine gegenüber der ob/ob-Maus deutlich verminderte Gewichtszunahme. Die Kreuzungstiere nehmen dabei pro Tag mehr Futter auf als die ob/ob-Maus (COHEN et al, 2002). (ab^J/ab^J)-Mäuse zeigen eine verminderte hepatische Synthese von Cholesterinestern und Triglyzeriden in der Leber und einen daraus resultierenden verminderten Triglyzeridgehalt im VLDL (MIYAZAKI et al, 2000). An einem SCD-1^(-/-)-Knockout-Modell kann selbst durch Fütterung einer fettreichen Diät (NTAMBI et al, 2002) oder einer lipogenen, kohlenhydratreichen Diät (MIYAZAKI et al, 2001) keine Adipositas ausgelöst werden. Die SCD-defizienten Tiermodelle exprimieren vermehrt Gene für die Lipidoxidation und haben eine erhöhte metabolische Rate. SCD-1^(-/-)-Mäuse zeigen außerdem eine gegenüber Kontrolltieren verbesserte Insulinsensitivität (RAHMAN et al, 2003; NTAMBI et al, 2002).

Tiere mit erhöhter SCD-Expression zeigen bei Normaldiät einen obesen Phänotyp, während bei einem Defekt der SCD selbst durch diätetische Maßnahmen keine Adipositas ausgelöst werden kann. Der Verlust der SCD-Genexpression resultiert weiterhin in verminderten Plasma-Triglyzeridspiegeln und einer verbesserten Insulinsensitivität.

Eine SCD-Hemmung wird als pharmakologische Intervention bei Adipositas, Hypertriglyzeridämie und Insulinresistenz diskutiert (NTAMBI et al, 2002; MIYAZAKI et al, 2001; MIYAZAKI et al, 2000).

IV.2.1 Grundlagen

IV.2.1.a Gesättigte Fettsäuren (Palmitat und Stearinsäure)

Palmitat ist mit einem Anteil von ca. 17% eine dominierende Fettsäure im Rattenfutter. Stearinsäure ist im Futter nur in sehr geringer Konzentration zu finden (siehe Anhang, Abb. VIII.2.a-1).

Palmitat entsteht endogen bei der de-novo Fettsäuresynthese in der Leber. Stearinsäure entsteht endogen durch Elongation von Palmitat.

Palmitat ist essentieller Baustein bei der Synthese von Ceramiden (LÖFFLER et al, 1997).

Palmitoyl-CoA hemmt in der Leber (WITITSUWANNAKUL et al, 1977) die Glykogensynthese. In Skelettmuskelzellen insulinresistenter Individuen hemmt Palmitat die insulinstimulierte Glykogensynthaseaktivität (KAUSCH et al, 2003). Gesättigte Fettsäuren hemmen außerdem die insulinstimulierte Glukoseaufnahme an der isolierten Skelettmuskelzelle (MONTELL et al, 2001).

Gesättigte Fettsäuren inhibieren verschiedene Enzyme der Fettsäuresynthese in der Leber, unter anderem die ACC (NIKAWA et al, 1979; KAWAGUCHI et al, 1974).

Bei der Fettsäureoxidation werden einfach ungesättigte Fettsäuren gegenüber gesättigten Fettsäuren wie Palmitat bevorzugt (DEMIZIEUX et al, 2001).

Gesättigte Fettsäuren werden nur verzögert in Triglyzeride eingebaut. Der Syntheseschritt von DAG zu Triglyzerid ist verlangsamt. Damit wird der Pool an DAG vergrößert, was in einer Hemmung der Insulinsignalkaskade resultiert (MONTELL et al, 2001).

IV.2.1.b Einfach ungesättigte Fettsäuren (Palmitoleinsäure und Ölsäure)

Während Palmitoleinsäure im Futter nur in sehr geringer Konzentration vorliegt, ist Ölsäure eine der dominierenden Fettsäuren im Futter (siehe Anhang, Abb. VIII.2.a-1).

Palmitoleinsäure und Ölsäure entstehen endogen durch Desaturierung ihrer gesättigten Äquivalente.

Einfach ungesättigte Fettsäuren werden rasch in Phospholipide und Triglyzeride eingebaut. Für die Fettsäureoxidation werden einfach ungesättigte Fettsäuren bevorzugt (DEMIZIEUX et al, 2001).

Ölsäure wird außerdem für die Synthese von Cholesterinestern in der Leber benötigt. Dabei wird nicht das Oleoyl-CoA aus der Nahrung, sondern endogen, mit Hilfe der SCD, synthetisiertes Oleoyl-CoA verwendet. Die SCD ist am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Da die Enzyme zur Fettsäureveresterung ebenfalls dort lokalisiert sind, können endogen desaturierte Fettsäuren direkt weiter verstoffwechselt werden (NTAMBI et al, 2003).

IV.2.1.c SCD-Isoformen

Bei verschiedenen Spezies wurden unterschiedliche Isoformen des SCD-Genes charakterisiert.

Bei der Maus existieren 3 SCD-Isoformen. Die SCD-1 wird primär in der Leber und im Fettgewebe, aber auch in der Muskulatur exprimiert. In beiden Geweben kann die Expression durch kohlenhydratreiche Diät erhöht werden. SCD-2 wird im zentralen Nervensystem primär während der neonatalen Myelinisierungsperiode exprimiert. Die Expression der SCD-3 beschränkt sich im wesentlichen auf die Talgdrüsen (MIYAZAKI et al, 2003).

Die Ratte exprimiert 2 Isoformen der SCD. Beim Menschen ist nur eine SCD-Isoform bekannt.

IV.2.1.d Regulation der SCD

Die SCD ist ein lipogenes Enzym. Die primäre Aufgabe dieses Enzyms scheint die Umsetzung von Fettsäuren in eine leicht veresterbare Form zu sein (NTAMBI et al, 2003; DEMIZIEUX et al, 2001).

Hohe Blutspiegel an Insulin, Glukose, gesättigten Fettsäuren und Nahrungscholesterin stimulieren die SCD. Auch SREBP-1c (Sterol-regulatory element binding protein-1c), ein Fettsäuresynthesegene aktivierender Transkriptionsfaktor, führt zu einer vermehrten Expression der SCD (NAKAMURA et al, 2002). Damit wird unter guten nutritiven Bedingungen der Weg zur Lipidspeicherung erleichtert. Glukagon, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acid, PUFA) und Leptin führen dagegen zu einer Hemmung der SCD. Die ungesättigten Fettsäuren werden nun, in einer Phase der vermehrten Fettsäureoxidation, bevorzugt für die Oxidation zur Verfügung gestellt. Die bevorzugte Oxidation in Kombination mit der verminderten SCD-Aktivität erklären die geringe postabsorptive Palmitoleoyl-CoA-Konzentration in der Leber.

IV.2.1.e Marker für die SCD-Aktivität

In der Literatur werden verschiedene Marker für die SCD-Aktivität vorgeschlagen. ATTIE et al (2002) schlagen das Verhältnis von C18:1 zu C18:0 bzw. C16:1 zu C16:0 im Plasma als Surrogat für die SCD-Aktivität vor. Der aus C18:1 und C18:0 gebildete „Desaturation Index“ („DI“) korreliert mit den Plasma-Triglyzeridspiegeln. Die Triglyzeridfraktion setzt sich aus den mit der Nahrung zugeführten sowie den aus der Leber freigesetzten VLDL-Triglyzeriden zusammen. Da C18:1 jedoch eine dominierende Fettsäure im Futter ist, kann keine Unterscheidung zwischen endogen entstandener und exogen zugeführter Ölsäure getroffen werden. Somit ist die Verwendung der Ölsäure als Surrogat für die SCD-Aktivität bei dieser Fütterung nicht aussagekräftig. Auch die für den zweiten Quotienten vorgeschlagene C16:0 ist eine dominierende Fettsäure im Futter. Eine vermehrte Futteraufnahme würde somit den „DI“ erniedrigen. Somit scheint auch dieser „DI“ nicht aussagekräftig zu sein. Die in der menschlichen Nahrung enthaltenen pflanzlichen Fette enthalten primär Linolsäure, Ölsäure und Palmitat. Fette tierischer Herkunft enthalten neben Palmitat ebenfalls vor allem Ölsäure.

Zusätzlich sind dort in höheren Konzentrationen Stearinsäure und Myristinsäure (C14:0) vorhanden (LASSERRE et al, 1985).

Eine andere Arbeitsgruppe beschreibt die Konzentration von C16:1 als möglichen Marker für Insulinresistenz im Skelettmuskel (HOUDALI et al, 2003). Da C16:1 im Futter nur in sehr geringer Konzentration vorhanden ist, kann gemessene Palmitoleinsäure nur Produkt der SCD sein. Die Menge an C16:1 scheint somit ein geeigneter Marker für die Aktivität der SCD zu sein.

Da eine hohe Gesamtlipidkonzentration eine höhere Konzentration an C16:1 zur Folge hat, wurde im Rahmen dieser Arbeit, um einen Einfluss der Gesamtlipidkonzentration auszuschließen, die Konzentration von C16:1 relativ zu den Gesamtlipiden angegeben (siehe Anhang, Kapitel VIII.5).

IV.2.1.f Mögliche Funktion der SCD im Organismus

Die SCD wird, wie oben erwähnt, als lipogenes Enzym beschrieben. Dieses Enzym scheint demnach primär bei der Bildung von Speicherlipiden eine Rolle zu spielen.

Aufgrund der PUFA-vermittelten Hemmung der SCD könnte die SCD-Aktivierung eine Maßnahme des Organismus sein, um ein Defizit an ungesättigten Fettsäuren auszugleichen.

Die negative Wirkung von gesättigten Fettsäuren in der Insulinsignalkaskade lässt die Vermutung zu, dass die Aktivierung der SCD ein protektiver Mechanismus gegen eine Akkumulation gesättigter Fettsäuren ist. Dafür spricht auch die Aktivierung der SCD durch gesättigte Fettsäuren.

IV.2.1.g SCD, Insulinresistenz und Diabetes

Insulinresistente, obese Individuen weisen eine erhöhte SCD-Expression auf. Die im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Daten zeigten bei den insulinresistenten Tieren in Leber, LONG, und Fettgewebe einen deutlich erhöhten Anteil an C16:1. Dies deutet auf eine erhöhte SCD-Expression in diesen Geweben hin. Die Tiere nehmen vermehrt Nahrung auf und befinden sich in einer anabolen Stoffwechsellage. Diese Beobachtungen erklären die erhöhte Aktivität der SCD. Ob die Aktivierung der SCD wirklich in einem kausalen Zusammenhang mit Insulinresistenz steht, oder Folge der Adipositas ist, kann nicht abschließend geklärt werden.

Die diabetischen Ratten zeigten sowohl in der Leber als auch im LONG gegenüber den prädiabetischen Tieren verminderte C16:1-Anteile. Der, in der Fraktion der FFS gemessene, Anteil an C16:1 war auch gegenüber den jüngeren Tieren vermindert (siehe Anhang, Abb. VIII.5.2-1). Da diese Abnahme von C16:1 bei den schlanken Tieren nicht beobachtet werden konnte, lässt sich daraus eine Abnahme der SCD-Aktivität aufgrund des Diabetes ableiten. Eine verminderte SCD-Aktivität bei insulinabhängigem Diabetes Mellitus ist in der Literatur beschrieben (MIMOUNI et al, 1992; ECK et al, 1979). Die SCD-Aktivität kann bei diesen Tieren durch Insulintherapie erhöht werden. Die verminderte SCD-Expression scheint demnach Folge des Insulindefizits zu sein.

IV.2.1.h SCD-Aktivität im postabsorptiven Zustand

Während der postabsorptiven Phase war der Anteil von C16:1 in der Leber mit Ausnahme der diabetischen Ratten bei allen untersuchten Gruppen deutlich vermindert (siehe Anhang, Abb. VIII.5.2-2). Dies entspricht einer insulinabhängigen Regulation der SCD. Die zuvor desaturierten Fettsäuren werden nun der Oxidation zur Verfügung gestellt. Es erfolgt keine Zufuhr von gesättigten Fettsäuren durch die Nahrung, was eine hohe Aktivität der SCD unnötig macht. Dies steht bei obesen Ratten im Konflikt mit dem ansteigenden HepCL-Gehalt und damit einer anabolen Situation (Abb. III.2.3.b-1 und Abb. III.3.3.b-1). Dieser könnte jedoch mit der Annahme erklärt werden, dass die oxidative und die sekretorische Kapazität hinsichtlich VLDL erschöpft ist. Somit wird trotz kataboler Stoffwechsellage Lipid in der Leber gespeichert. Ein extremer Anstieg der Desaturaseaktivität bei Anfütterung ist in der Literatur beschrieben (OSHINO et al, 1972). Dieser Anstieg konnte bei allen untersuchten Gruppen beobachtet werden. Die Aktivierung der SCD kann in dieser Situation über Insulin, Glukose, gesättigte Fettsäuren sowie Nahrungscholesterin erfolgen.

IV.2.2 Hemmung der SCD als therapeutische Maßnahme

Aufgrund der Daten, welche mit Hilfe der SCD-defizienten Tiermodelle erhoben wurden, scheint ein Zusammenhang zwischen erhöhter SCD-Aktivität und einem obesen, hypertriglyzeridämischen und insulinresistenten Phänotyp zu bestehen. Gesättigte Fettsäuren bewirken einerseits über ACC-Hemmung die Absenkung der de-novo Fettsäuresyntheserate und ermöglichen andererseits über dadurch bedingte sinkende Malonyl-CoA-Spiegel die β -Oxidation. Eine Desaturierung würde daher eine erhöhte Fettsäuresyntheserate bei gehemmter Oxidation bewirken.

Bei Untersuchungen an Adipositas- und Insulinresistenz-Modellen stellt sich jedoch die Frage nach der Kausalität: Der Defekt bei der Leptinsynthese oder am Leptinrezeptor führt bei den Adipositas-Modellen zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme. Damit ist die zu metabolisierende Lipidmenge bei diesen Tieren größer. Die darin enthaltenen gesättigten Fettsäuren führen zu einer Aktivierung der SCD. Eine SCD-Inhibition würde somit die Überführung der Fettsäuren in ihre Speicherform hemmen und zu einer Akkumulation im DAG führen. Dies wiederum hätte eine inhibitorische Wirkung auf die Insulinsignalkaskade.

Aufgrund der momentan verfügbaren Daten ist eine endgültige Bewertung der SCD als Target nicht möglich.

Für eine abschließende Beurteilung müsste ein potenter SCD-Inhibitor bei obesen, insulinresistenten Tiermodellen getestet werden.

Dabei könnte auch die mögliche Indikation für einen solchen Inhibitor geklärt werden: Führt die Hemmung der SCD zu einer Gewichtsreduktion? Ist diese Gewichtsreduktion verbunden mit einer Verbesserung der Hyperlipidämie? Kann ein SCD-Inhibitor sogar die Insulinwirkung verbessern?

IV.3 Zusammenhang von Muskelfasertyp, Substratoxidation und IMCL

Die verschiedenen Skelettmuskeln weisen hinsichtlich ihres bevorzugten Substrates zur Energiegewinnung eine unterschiedliche Enzymausstattung auf. Dabei gewinnen „fast-twitch“-Muskeln ihre Energie primär durch anaerobe Glykolyse. „Slow-twitch“-Muskeln hingegen generieren ihre Energie durch aerobe Lipidoxidation. Eine weitere Differenzierung des „fast-twitch“-Muskels hinsichtlich seiner Fähigkeit zur aeroben Glukoseoxidation, fand im Rahmen der durchgeführten Fasertypisierung nicht statt.

IV.3.1 Fasertypen der ¹H-NMR-spektroskopisch und biochemisch untersuchten Skelettmuskeln

Aufgrund der von der AMP-Lab GmbH durchgeführten Untersuchungen konnten TIB und LONG dem „fast-twitch“-, SOL hingegen dem „slow-twitch“-Muskelfasertyp zugeordnet werden. EDL wurde als intermediärer Skelettmuskel, mit Anteilen beider Fasertypen identifiziert (siehe Anhang, Kapitel VIII.1).

IV.3.2 Fasertypveränderungen bei veränderten metabolischen Bedingungen

Die enzymatische Ausstattung kann infolge metabolischer Veränderungen modifiziert werden: Die oxidative Kapazität von Skelettmuskelfasern nimmt beim Menschen im Alter ab (KENT-BRAUN et al, 2000). Die beschriebene Abnahme der oxidativen Kapazität scheint jedoch primär Folge einer geringeren körperlichen Aktivität im Alter zu sein. Im Tierversuch kann durch Immobilisation eine verminderte oxidative Kapazität bei gleichzeitiger Erhöhung der glykolytischen Kapazität ausgelöst werden (OHIRA et al, 1992; DIFFEE et al, 1991). Umgekehrt lässt sich durch physische Aktivität die oxidative Kapazität verbessern (GOUBEL et al, 1987; GREEN et al, 1984). Bei hohen Seruminsulinspiegeln werden im Skelettmuskel oxidative Muskelfasern durch glykolytische ersetzt (HOLMÄNG et al, 1993). Eine Humanstudie beschreibt einen verminderten Anteil oxidativer Muskelfasern bei obesen Menschen (TANNER et al, 2002). Das Verhältnis aus glykolytischer und oxidativer Enzymaktivität im Skelettmuskel korreliert negativ mit dessen Insulinsensitivität (SIMONEAU et al, 1997; JAMES et al, 1985). Eine unabhängig von Adipositas verminderte oxidative Kapazität in der Skelettmuskulatur

hyperglykämischer Individuen ist bei Goto-Kakizaki-Ratten nachgewiesen (YASUDA et al, 2002).

Diese Veränderungen lassen sich auf zwei unterschiedlichen Stoffwechselsituationen zusammenfassen: Bei guten nutritiven Bedingungen (hohe Insulinspiegel, verminderter Energiebedarf durch Immobilisation) wird die glykolytische Kapazität, bei Energiemangel (Energieverbrauch durch Aktivität) die oxidative Kapazität erhöht.

IV.3.3 Unterschiede im Lipidstoffwechsel bei verschiedenen Fasertypen

Eine Erhöhung der oxidativen Kapazität geht einher mit erhöhter mLPL-Aktivität (CORTRIGHT et al, 1997). Auch die Triglyzeridsyntheserate ist im oxidativen Muskel höher als im glykolytischen (BUDOHOSKI et al, 1996). Die gemessene hohe HK-Aktivität bei gleichzeitig geringer Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)-Aktivität lässt die Spekulation zu, dass die phosphorylierte Glukose nicht vollständig metabolisiert wird, sondern das Glycerol für die Triglyzeridsynthese zur Verfügung stellt. Dementsprechend hoch ist auch der Triglyzeridgehalt im oxidativen Muskel (SPRIET et al, 1986). Durch Bestimmung der Glycerin-3-Phosphat-Konzentration könnte die Frage, ob die phosphorylierte Glukose für die Triglyzeridsynthese oder für die Glykogensynthese zur Verfügung gestellt wird, geklärt werden. Ein direkter Vergleich des IMCL-Gehaltes verschiedener Muskelfasertypen ist aufgrund ihres unterschiedlichen tCr-Gehaltes schwierig. Jedoch kann aufgrund des im oxidativen Muskel geringeren tCr-Gehaltes bei, unter gefütterten Bedingungen, tendenziell erhöhtem IMCL / tCr-Verhältnis auf einen absolut höheren IMCL-Gehalt im oxidativen Muskel geschlossen werden

Trotz der in oxidativen Muskeln sehr hohen Triglyzeridsyntheserate ist die DAG-Konzentration in diesen Fasertypen nur gering (DYCK et al, 1997). Dieser geringe DAG-Gehalt kann eine Erklärung dafür sein, dass oxidative Muskeln trotz eines hohen Triglyzeridgehaltes insulin sensitiv sind.

IV.4 Ausblick

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen führten zu einigen unerwarteten Ergebnissen aber auch zu vielen neuen Fragen:

Es konnte herausgearbeitet werden, dass dem SOL mit seiner hohen oxidativen Kapazität eine Sonderstellung zukommt. Dieser Muskel zeigte weder beim IMCL noch beim Malonyl-CoA eine Reaktion auf die veränderten nutritiven Bedingungen. Ist dies Ausdruck der verbesserten Fähigkeit dieses Muskelfasertyps, eine erhöhte Lipidbelastung durch vermehrte Oxidation abzupuffern? Verändert sich bei diesem Fasertyp postabsorptiv die LCACoA-Konzentration? Wie hoch ist die LCACoA-Konzentration im oxidativen Muskel?

Welche Veränderungen führen bei den behandelten Tieren dazu, dass der SOL plötzlich eine Dynamik zeigt? Verändert sich der Fasertyp dieses Muskels durch die Behandlung? Ist die postabsorptive Lipidbelastung derart erhöht, dass sich im SOL ein neues Kompartiment zur Lipidspeicherung bildet?

Über die absolute Lipidbelastung, der die Organe unter postabsorptiven Bedingungen ausgesetzt sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nur spekuliert werden. Hier wären Studien über den Fettsäureflux indiziert. Nur so können Aussagen über die tatsächliche Potenz der einzelnen Organe hinsichtlich des katabolen Lipidmetabolismus getroffen werden.

Zur weiteren Aufklärung der Pathogenese der Insulinresistenz müsste eine Analyse von DAG und Ceramid durchgeführt werden.

Die weitere pharmakologische Charakterisierung des PPAR- α -Agonisten müsste an Tierarten erfolgen welche, entsprechend den Verhältnissen beim Menschen, keine Peroxisomenproliferation zeigen. Nur dadurch kann eine verbesserte Lipidoxidation durch diese Substanz ohne Einfluss der peroxisomalen β -Oxidation nachgewiesen werden.

Eine abschließende Bewertung der SCD als Target kann nur über den Einsatz potenter Inhibitoren dieses Enzyms erfolgen.

V Zusammenfassung / Summary

V.1 Zusammenfassung

Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes stellen ein wachsendes Gesundheitsproblem der Industrienationen dar. Die molekulare Grundlage der Insulinresistenz ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es besteht jedoch ein Zusammenhang zwischen verminderter Insulinwirkung und Störungen im Fettstoffwechsel. Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine primär auf den Lipidstoffwechsel wirkende antidiabetische Substanz pharmakologisch charakterisiert. Diese Charakterisierung erfolgte im Zusammenhang mit einer Phase der Nahrungskarenz.

Dafür wurde in vivo die Dynamik intramyo- und hepatozellulärer Lipide (IMCL und HepCL) ¹H-NMR-spektroskopisch bestimmt. IMCL und HepCL sind Surrogatparameter für die Insulinsensitivität. Mittels HPLC erfolgte außerdem die Analyse verschiedener Spezies langkettiger aktivierter Fettsäuren (LCACoA) in Skelettmuskulatur und Leber. Die LCACoA sollen eine kausale Rolle bei der Pathogenese der Insulinresistenz spielen. Die Untersuchungen erfolgten während einer 3-tägigen Phase der Nahrungskarenz an unterschiedlichen Ratten (insulinsensitiv, insulinresistent, diabetisch sowie unter Behandlung mit Antidiabetika).

Bei diesen Untersuchungen konnte eine ausgeprägte, muskelfasertypspezifische Dynamik des IMCL gezeigt werden: Trotz der postabsorptiv erhöhten β -Oxidationsrate wurde ein schneller Anstieg des IMCL-Gehaltes in glykolytischen Muskeln beobachtet. Bei Nahrungskarenz wird aus den Adipozyten mehr Lipid freigesetzt, als aktuell für die Energieversorgung peripherer Gewebe benötigt wird. Dieses Lipid wird in Form von IMCL gespeichert. Muskeln mit hoher Kapazität zur Lipidoxidation zeigten hinsichtlich ihres IMCL-Gehaltes im Versuchsverlauf keinerlei Dynamik.

Die IMCL-Erhöhung scheint ein protektiver Mechanismus zu sein, um eine Erhöhung intrazellulärer LCACoA-Konzentrationen zu vermeiden: Die muskuläre LCACoA-Konzentration blieb bei insulinsensitiven Ratten postabsorptiv konstant.

In der Leber insulinsensitiver Ratten führte die erhöhte adipozytäre Lipolyserate nicht zu einer Erhöhung des HepCL. Bei insulinresistenten Ratten stieg

HepCL dagegen postabsorptiv an. Die hepatische LCACoA-Konzentration stieg bei allen untersuchten Ratten an.

Eine Prävention des Diabetes durch PPAR- α -Agonisten senkte bei gefütterten Tieren den IMCL- und HepCL-Gehalt. Die postabsorptive adipozytäre Lipolyse führte jedoch zu deutlich höheren IMCL- und HepCL-Werten als bei unbehandelten Ratten.

Im Rahmen der LCACoA-Analysen zeigte C16:1 eine von den anderen aktivierten Fettsäuren abweichende Dynamik. C16:1 wird endogen über die Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD) gebildet. Dieses Enzym wird momentan in der Literatur als potentiell Target für die Entwicklung neuer antidiabetisch wirksamer Substanzen diskutiert. Bei den durchgeführten Untersuchungen war bei den insulinresistenten Tieren die Konzentration von C16:1 mit Ausnahme der FFS im Serum in allen untersuchten Geweben erhöht.

V.2 Summary

Today, insulin resistance and type 2 diabetes are among the main threats to human health in industrial nations. However, the molecular basis of insulin resistance is not entirely understood. There is a link between diminished efficiency of insulin and defective lipid metabolism. The aim of this work was to characterize an antidiabetic drug exerting a major effect on lipid metabolism. This characterization was performed in connection with increased lipolysis and lipid oxidation during a period of starvation.

Therefore, the dynamics of intramyo- and hepatocellular lipids (IMCL and HepCL) were measured by ¹H-NMR-spectroscopy. IMCL and HepCL serve as surrogate parameters for insulin sensitivity. In parallel different species of long chain acyl CoA (LCACoA) in liver and skeletal muscle were analyzed by HPLC. LCACoA are proposed to be a causative factor in the pathogenesis of insulin resistance. Experiments were performed during a 3 day-starvation period in different rat strains: insulin sensitive, insulin resistant and diabetic rats. Furthermore, insulin resistant rats were treated with different antidiabetic agents.

The investigations showed rapid, muscle fiber type specific dynamics of IMCL: Despite the increased β -oxidation during starvation, IMCL increased rapidly in glycolytic muscles. During starvation, adipocytes release more lipids than peripheral tissues actually need. These lipids are stored in skeletal muscle cells as IMCL. However, muscles with a high capacity for lipid oxidation showed no dynamics regarding IMCL-content during the period of starvation.

The increase of IMCL seems to prevent an accumulation of muscle LCACoA: In insulin sensitive rats, total-LCACoA remained constant during the whole study period.

With regard to the liver, increased lipolysis in adipocytes did not lead to an increase of HepCL in insulin sensitive rats. Insulin resistant rats coped differently with the increased lipolysis during starvation: Increased lipid content in plasma resulted in an accumulation of HepCL. Hepatic LCACoA-concentrations were increased in all rats during starvation.

Prevention of diabetes by treatment with PPAR-agonists decreased IMCL and HepCL in fed state. However, during postabsorptive lipolysis, IMCL and HepCL increased to a much higher level than in untreated rats.

Analysis of the LCACoA-species revealed, that C16:1 displayed completely different dynamics than all the other fatty acids. C16:1 is synthesized endogenously

by Stearoyl-CoA Desaturase (SCD). Actually this enzyme is discussed to be a potential drug-target for the development of antidiabetic agents. The results of the LCACoA-analysis yielded elevated concentrations of C16:1 in liver, muscle and adipose tissue in obese rats.

VI Literaturverzeichnis

- Abadie JM, Malcom GT, Porter JR, Svec F (2001).** *Can associations between free fatty acid levels and metabolic parameters determine insulin resistance development in obese Zucker rats?*. Life Sciences 69:2675-2683
- Adams JM, Pratipanawatr T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC, Mandarino LJ (2004).** *Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans.* Diabetes 53:25-31
- Anderwald C, Bernroider E, Krssak M, Stingl H, Brehm A, Bischof MG, Nowotny P, Roden M, Waldhausl W (2002).** *Effects of insulin treatment in type 2 diabetes patients on intracellular lipid content in liver and skeletal muscle.* Diabetes 51:3025-3032
- Armstrong R, Phelbs R (1984).** *Muscle fiber type composition in the rat hindlimb.* Am J Anat 171:259-272
- Attie AD, Krauss RM, Gray-Keller MP, Brownlie A, Miyazaki M, Kastelein JJ, Lusis AJ, Stalenhoef AFH, Stoehr JP, Hayden MR, Ntambi JM (2002).** *Relationship between stearoyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia.* J Lipid Res 43:1899-1907
- Boden G (1997).** *Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM.* Diabetes 46:3-10
- Boden G, Lebed B, Schatz M, Homko C, Lemieux S (2001).** *Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects.* Diabetes 50:1612-1617
- Boden G, Shulman GI (2002).** *Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction.* Eur J Clin Invest 32 suppl 3:14-23
- Bottomley PA (1987).** *Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo.* Ann NY Acad Sci, 508:333-348
- Brechtel K, Dahl DB, Machann J, Bachmann OP, Wenzel I, Maier T, Claussen CD, Häring HU, Jacob S, Schick F (2001).** *Fast elevation of the intramyocellular lipid content in the presence of circulating free fatty acids and hyperinsulinemia: A dynamic ^1H -MRS study.* Magn Res in Med 45:179-183
- Brechtel K, Machann J, Jacob S, Strempler A, Schick F, Häring HU, Claussen CD (1999).** *In vivo ^1H -MR-Spektroskopie: Bestimmung des intra- und extramyozellulären Lipidgehalts in Abhängigkeit von der Insulinwirkung bei direkten Nachkommen von Typ-II-Diabetikern.* Fortschr Röntgenstr 171:113-120
- Brechtel K, Niess AM, Machann J, Rett K, Schick F, Claussen CD, Dickhuth HH, Häring HU, Jacob S (2001).** *Utilisation of intramyocellular lipids (IMCLs) during exercise as assessed by proton magnetic resonance spectroscopy (^1H -MRS).* Horm Metab Res 33:63-66
- Brochu M, Starling RD, Tchernof A, Matthews DE, Garcia-Rubi E, Poehlman ET (2000).** *Visceral adipose tissue is an independent correlate of glucose disposal in older obese postmenopausal women.* J Clin End Metab 85:2378-2384
- Brosnan CA, Upchurch S, Schreiner B (2001).** *Type 2 diabetes in children and adolescents: An emerging disease.* J Pediatr Health Care 15:187-193

- Brun T, Roche E, Assimacopoulos-Jeannet F, Corkey BE, Kim KH, Prentki M (1996).** *Evidence for an anaplerotic/malonyl-CoA pathway in pancreatic beta-cell nutrient signalling.* Diabetes 45:190-198
- Budohoski L, Gorski J, Nazar K, Kaciuba-Uscilko H, Terjung RL (1996).** *Triacylglycerol synthesis in the different skeletal muscle fiber sections of the rat.* Am J Physiol 271:E574-E581
- Cahill GF, Owen OE (1968).** *Carbohydrate metabolism and its disorders.* London Academic Pr. 497-522
- Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, Li G, Dobrowsky RT, Florant GL, Summers SA (2003).** *A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids.* J Biol Chem 278:10297-10303
- Chen MT, Kaufmann LN, Spennetta T, Shrago E (1992).** *Effects of high fat-feeding to rats on the interrelationship of body weight, plasma insulin, and fatty acyl-Coenzyme A esters in liver and skeletal muscle.* Metabolism 41:564-569
- Chien D, Dean D, Saha, AK, Flatt JP, Ruderman NB (2000).** *Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo.* Am J Physiol 279:E259-E265
- Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, Sharma R, Hudgins LC, Ntambi JM, Friedman JM (2002).** *Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss.* Science 297:240-243
- Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH, Arky RA, Speizer FE (1990).** *Weight as a risk factor for clinical diabetes in women.* Am J Epidemiol 132:501-513
- Commerford AR, Pagliassotti MJ, Melby CL, Wie Y, Gayles AC, Hill JO (2000).** *Fat oxidation, lipolysis, and free fatty acid cycling in obesity-prone and obesity-resistant rats.* Am J Physiol 279:E875-E885
- Cooney GJ, Thompson AL, Furler SM, Ye J, Kraegen ER (2002).** *Muscle long-chain acyl CoA esters and insulin resistance.* Ann NY Acad Sci 967:196-207
- Cortright RN, Muoio DM, Dohm GL (1997).** *Skeletal muscle lipid metabolism: A frontier for new insights into fuel homeostasis.* J Nutr Biochem 8:228-245
- Cusi K, Consoli A, DeFronzo RA (1996).** *Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus.* J Clin Endocrinol Metab 81:4059-4067
- Cusi K, DeFronzo RA (1998).** *Metformin: a review of its metabolic effects.* Diabetes reviews 6:89-131
- Daugaard JR, Richter EA (2001).** *Relationship between muscle fibre composition, glucose transport protein 4 and exercise training: possible consequences on non-insulin-dependent diabetes mellitus.* Acta Physiol Scand 171:267-276
- De Souza CJ, Eckhardt M, Gagen K, Dong M, Chen W, Laurant D, Burkey F (2001).** *Effects of Pioglitazone on adipose tissue remodelling within the setting of obesity and insulin resistance.* Diabetes 50:1863-1871
- DeFronzo RA (1988).** *The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM.* Diabetes 37:667-687
- Demizieux L, Degrace P, Gresti J, Narce M, Poisson JP, Clouet P (2001).** *Shifted cooperation of desaturation and oxidation of palmitic acid in rat liver.* New Avenues of Research in Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Metabolism 23-27
- Desvergne B, Wahli W (1999).** *Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism.* Endocrine Reviews 20:649-688

- Deutsch J, Grange E, Rapoport SI, Purdon AD (1994).** *Isolation and quantitation of long-chain acyl-coenzyme A esters in brain tissue by solid-phase extraction.* Analytical Biochemistry 220:321-323
- Diamond J (2003).** *The double puzzle of diabetes.* Nature 423:599-602
- Diffie GM, Caiozzo VJ, Herrick RE, Baldwin KM (1991).** *Contractile and biochemical properties of rat soleus and plantaris after hindlimb suspension.* Am J Physiol 260:C528—C534
- Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI (1999).** *Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity.* J Clin Invest 103:253-259
- Drynen L, Quant PA, Zammi VA (1996).** *The role of changes in the sensitivity of hepatic mitochondrial overt carnitine palmitoyltransferase in determining the onset of the ketosis of starvation in rat.* Biochem J 318:767-770
- Dyck DJ, Peters SJ, Glatz J, Gorski J, Keizer H, Kiens B, Liu S, Richert EA, Spriet LL, Van der Vusse GJ, Bonen A (1997).** *Functional differences in lipid metabolism in resting skeletal muscle of various fiber types.* Am J Physiol 272:E340-E351
- Eck MG, Wynn JO, Carter WJ, Faas FH (1979).** *Fatty acid desaturation in experimental diabetes mellitus.* Diabetes 28:479-485
- Ellis BA, Poynten A, Lowy AJ, Furler AM, Chisholm DJ, Kraegen EW, Cooney GJ (2000).** *Long-chain acyl-CoA esters as indicators of lipid metabolism and insulin sensitivity in rat and human muscle.* Am J Physiol 279:E554-E560
- Enser M (1975).** *Desaturation of stearic acid by liver and adipose tissue from obese-hyperglycaemic mice (ob/ob).* Biochem J 148:551-555
- Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K (2001).** *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* Urban und Fischer
- Friedman J (2002).** *Fat in all the wrong places.* Nature 415:268-269
- Gibbons GF, Islam K, Pease RJ (2000).** *Mobilisation of triacylglycerol stores.* BBA 1483:37-57
- Goldstein BJ (2002).** *Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus.* Am J Cardiol 90, Suppl:3G-10G
- Gordon ES (1960).** *Non-esterified fatty acids in blood of obese and lean subjects.* Am J Clin Nutr 8:740-747
- Goubel F, Marini JF (1987).** *Fibre type transformations and stiffness modification of soleus muscle of trained rats.* Pflügers Arch 410:321-325
- Green HJ, Klug GA, Reichmann H, Seedorf U, Wiehrer W, Pette D (1984).** *Exercise-induced fibre type transitions with regard to myosin, parvalbumin, and sarcoplasmic reticulum in muscles of the rat.* Pflügers Arch 400:432-438
- Griffen S, Wang J, German M (2001).** *A genetic defect in β -cell gene expression segregates independently from the fa locus in the ZDF rat.* Diabetes 50:63-68
- Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI (1999).** *Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signalling cascade.* Diabetes 48:1270-1274
- Groop, LC (1999).** *Insulin resistance: the fundamental trigger of type 2 diabetes.* Diabetes, Obesity and Metabolism 1, Suppl.1:S1-S7
- Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Steppan CM, Lazar MA (2002).** *A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents.* Nature Medicine 8:1122-1128

- Harmon JS, Gleason CE, Tanaka Y, Poitout V, Robertson RP (2001).** *Antecedent hyperglycemia, not hyperlipidemia, is associated with increased islet triacylglycerol content and decreased insulin gene mRNA level in Zucker diabetic fatty rats.* Diabetes 50:2481-2486
- He J, Watkins S, Kelley DE (2001).** *Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity.* Diabetes 50:817-823
- Hegarty BD, Furler SM, Ye J, Cooney GJ, Kraegen EW (2003).** *The role of intramuscular lipid in insulin resistance.* Acta Physiol Scand 178:373-383
- Herzig S, Hedrick S, Morante I, Koo SH, Galimi F, Montminy M (2003).** *CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPAR- γ .* Nature 426:190-193
- Himsworth HP (1936).** *Diabetes Mellitus – Its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types.* Lancet 227:127-130
- Hockings PD, Changani KK, Saeed N, Reid DG, Birmingham J, O'Brien P, Osborne J, Toseland CN, Buckingham RE (2003).** *Rapid reversal of hepatic steatosis, and reduction of muscle triglyceride, by rosiglitazone: MRI/S studies in Zucker fatty rats.* Diabetes, Obesity and Metabolism 5:234-243
- Holmång A, Brzezinska Z, Björntorp P (1993).** *Effects of hyperinsulinemia on muscle fiber composition and capillarization.* Diabetes 42:1073-1081
- Houdali B, Wahl HG, Kresi M, Nguyen V, Haap M, Machicao F, Ammon HPT, Renn W, Schleicher ED, Häring HU (2003).** *Glucose oversupply increases $\Delta 9$ -desaturase expression and its metabolites in rat skeletal muscle.* Diabetologia 46:203-212
- Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schumann WC, Petersen KF, Landau BR, Shulman GI (2000).** *Mechanism by which Metformin reduces glucose production in type 2 diabetes.* Diabetes 49:2063-2069
- Hwang JH, Pan JW, Heydari S, Hetherington HP, Stein DT (2001).** *Regional differences in intramyocellular lipids in humans observed by in vivo $^1\text{H-MR}$ spectroscopic imaging.* J Appl Physiol 90:1267-1274
- Ide T, Nakazawa T, Mochizuki T, Murakami K (2000).** *Tissue specific actions of antidiabetic thiazolidinediones on the reduced fatty acid oxidation in skeletal muscle and liver of ZDF rats.* Metabolism 49:521-525
- Jacob S, Machann J, Rett K, Brechtel K, Volk A, Renn W, Maerker E, Matthaei S, Schick F, Claussen CD, Häring HU (1999).** *Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects.* Diabetes 48:1113-1119
- James DE, Jenkins AB, Kraegen EW (1985).** *Heterogeneity of insulin action in individual muscles in vivo: euglycemic clamp studies in rats.* Am J Physiol 248:E567-E574
- Jaromowska M, Gorski J (1985).** *Effect of fasting on skeletal muscle triglyceride content.* Experimentia 41:357-358
- Jones BH, Maher MA, Banz WJ, Zemel MB, Whelan J, Smith PJ, Moustaid N (1996).** *Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids.* Am J Physiol 271:E44-E49
- Jucker BM, Schaeffer TR, Haimbach RE, Mayer ME, Ohlstein DE, Smith SA, Cobitz AR, Sarkar SK (2003).** *Reduction of intramyocellular lipid following short-term rosiglitazone treatment in Zucker fatty rats: An in vivo nuclear magnetic resonance study.* Metabolism 52:218-225

- Jucker BM, Schaeffer TR, Haimbach RE, McIntosh TS, Chun D, Mayer M, Ohlstein DH, Davis HM, Smith SA, Cobitz AR, Sarkar SK (2002).** *Normalization of skeletal muscle glycogen synthesis and glycolysis in rosiglitazone-treated Zucker Fatty rats – An in vivo nuclear magnetic resonance study.* Diabetes 51:2066-2073
- Kahn BB, Flier JS (2000).** *Obesity and insulin resistance.* J Clin Invest 106:473-481
- Kahn CR (1978).** *Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction.* Metabolism 27:1893-1902
- Karasik A, Masakazu H (1985).** *Use of animal models in the study of diabetes.* In: Joslin's Diabetes (Joslin EP et al) 317-350
- Kausch C, Staiger H, Staiger K, Krützfeldt J, Matthaei S, Häring HU, Stumvoll M (2003).** *Skeletal muscle cells from insulin-resistant (non-diabetic) individuals are susceptible to insulin desensitization by palmitate.* Horm Metab Res 35:570-576
- Kawaguchi A, Bloch K (1974).** *Inhibition of glucose 6-phosphate dehydrogenase by palmitoyl coenzyme A.* J Biol Chem 249:5793-5800
- Kelley DE (2002).** *Skeletal muscle triglycerides – an aspect of regional adiposity and insulin resistance.* Ann NY Acad Sci 967:135-145
- Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA (1999).** *Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss.* Am J Physiol 277:E1130-E1141
- Kent-Braun JA, NG AV (2000).** *Skeletal muscle oxidative capacity in young and older women and men.* J Appl Physiol 89:1072-1078
- Keppler D, Decker K (1974).** *Methoden der enzymatischen Analyse 3. Auflage.* H.U. Bergmeyer Berlin: Akademie Verlag
- Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W (1999).** *Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting.* J Clin Invest 103:1489-1498
- Kim JK, Fillmore JJ, Chen Y, Yu C, Moore IK, Pypaert M, Lutz EP, Kako Y, Velez-Carrasco W, Goldberg IJ, Breslow JL, Shulman GI (2001).** *Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance.* PNAS 98:7522-7527
- Kim JY, Koves TR, Yu GS, Gulick T, Cortright RN, Dohm GL, Muoio DM (2002).** *Evidence of a malonyl-CoA-insensitive carnitine palmitoyltransferase I activity in red skeletal muscle.* Am J Physiol 282:E1014-E1022
- Kraegen EW, Cooney CJ, Ye JM, Thompson AL, Furler SM (2001).** *The role of lipids in the pathogenesis of muscle insulin resistance and beta cell failure in type II diabetes and obesity.* Exp Clin Endocrinol Diabetes 109, Suppl 2:S189-S201
- Krinke G (2000).** *The laboratory rat – The handbook of experimental animals.* Academic Press
- Krssak M, Petersen KF, Bergeron R, Price T, Laurent D, Rothman DL, Roden M, Shulman GI (2000).** *Intramuscular Glycogen and intramyocellular lipid utilization during prolonged exercise and recovery in man: A ^{13}C and 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy study.* J Clin Endocrin & Metab 85:748-754
- Krssak M, Petersen KF, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, Shulman GI, Roden M (1999).** *Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a 1H NMR study.* Diabetologia 42:113-116

- Kruszynska YT, McCormack JG (1989).** *Effect of nutritional status on insulin sensitivity in vivo and tissue enzyme activities in the rat.* Biochem J 258:699-707
- Kuhlmann J (2002).** *Untersuchungen zur Wechselbeziehung zwischen Insulinresistenz und intramyozellulärem Lipid an Ratten.* Dissertation an der JLU Giessen
- Kuhlmann J, Neumann-Haefelin C, Belz U, Kalisch J, Juretschke HP, Stein M, Kleinschmidt E, Kramer W, Herling AW (2003).** *Intramyocellular lipid and insulin resistance . a longitudinal in vivo ¹H-spectroscopic study in zucker diabetic fatty rats.* Diabetes 52:138-144
- Ladu MJ, Kapsas H, Palmer WK (1991).** *Regulation of lipoprotein lipase in adipose and muscle tissues during fasting.* Am J Physiol 260:R953-R959
- Lasserre M, Mendy F, Spielmann D, Jacotot B, Inserum U (1985).** *Effects of different dietary intake of essential fatty acids on C20:3 ω 6 and C20:4 ω 6 serum levels in human adults.* Lipids 20:227-233
- Lebowitz HE (2001).** *Insulin resistance: definition and consequences.* Exp Clin Endocrinol Diabetes 109, Suppl 2:S135-S148
- Lemberger T, Desvergne B, Wahli W (1996).** *Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signalling pathway in lipid physiology.* Ann. Rev. Cell. Dev. Biol. 12:335-363
- Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A (2002).** *Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes.* Endocrine Reviews 23:201-229
- Löffler G, Petriedes PE (1997).** *Biochemie und Pathobiochemie.* Springer Verlag
- Mangino M, Zografakis J, Murphy MK, Anderson CB (1992).** *Improved and simplified tissue extraction method for quantitating long-chain acyl-coenzyme A thioesters with picomolar detection using high-performance liquid chromatography.* J Chromatography 577:157-162
- Mansell PI, Macdonald IA (1990).** *The effect of starvation on insulin-induced glucose disposal and thermogenesis in humans.* Metabolism 39:502-510
- Marceau P, Biron S, Hould FS, Marceau S, Simard S, Thung SN, Kral JG (1999).** *Liver pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity.* J Clin Endocrinol Metab 84:1513-1517
- Masoro EJ (1967).** *Skeletal muscle lipids.* J Biol Chem 242:1111-1114
- Matthaei S, Sturmvoll M, Häring HU (2001).** *Thiazolidindione (Insulinsensitizer) – Neue Aspekte in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2.* Deutsches Ärzteblatt 98:A912-A918
- Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW, Enocksson S, Inzucchi SE, Shulman GI, Petersen KF (2002).** *The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes.* Diabetes 51:797-802
- McGarry J, Brown N (1997).** *The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis.* Eur J Biochem 244:1-14
- McGarry JD (2002).** *Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes.* Diabetes 51:7-18
- McGarry JD, Dobbins RL (1999).** *Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion.* Diabetologia 42:128-138
- McGarry JD, Leatherman GF, Foster DW (1978).** *Carnitine Palmitoyltransferase I – The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by Malonyl-CoA.* J Biol Chem 253:4128-4136

- Meertens LM, Miyata KS, Cechetto JD, Rachubinski RA, Capone JP (1998).** *A mitochondrial ketogenic enzyme regulates its gene expression by association with the nuclear hormone receptor PPAR α .* The EMBO Journal 17:6973-6978
- Mimouni V, Poisson JP (1992).** *Altered desaturase activities and fatty acid composition in liver microsomes of spontaneously diabetic Wistar BB rat.* (BBA 1123:296-302
- Miyazaki M, Kim YC, Gray-Keller MP, Attie AD, Ntambi JM (2000).** *The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1.* J Biol Chem 275:30132-30138
- Miyazaki M, Kim YC, Ntambi JM (2001).** *A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis.* J Lipid Res 42:1018-1024
- Miyazaki M, Ntambi JM (2003).** *Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism.* Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 68:113-121
- Montell E, Turini M, Marotta M, Roberts M, Noe V, Ciudad CJ, Mace K, Gomez-Foix AM (2001).** *DAG accumulation from saturated fatty acids desensitises insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells.* Am J Physiol 280:E229-E237
- Mystkowski P, Shankland E, Schreyer SA, LeBoeuf RC, Schwartz RS, Cummings DE, Kushmerick M, Schwartz MW (2000).** *Validation of whole-body magnetic resonance spectroscopy as a tool to assess murine body composition.* Int J Obesity 24:719-724
- Nakamura MT, Nara TY (2002).** *Gene regulation of mammalian desaturases.* Biochemical Society Transactions 30:1076-1079
- Nationale Versorgungsleitlinie Diabetes mellitus Typ 2 (2003).** *Basistherapie.* Herausgeber: Bundesärztekammer, Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, Deutsche Diabetische Gesellschaft, Fachkommission Diabetes Sachsen, Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften; www.leitlinien.de/versorgungsleitlinien/diabetes/diabetes2
- Neumann-Haefelin C, Kuhlmann J, Belz U, Kalisch J, Quint M, Gerl M, Juretschke HP, Herling AW (2003).** *Determinants of intramyocellular lipid concentrations in rat hindleg muscle.* Magn Reson Med 50:242-248
- Nikawa j; Tanabe T, Ogiwara H, Shiba T, Numa S (1979).** *Inhibitory effects of long-chain acyl coenzyme A analogues on rat liver acetyl coenzyme A carboxylase.* FEBS Letters 102:223-226
- Ntambi JM (1999).** *Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol.* J Lipid Res 40:1549-1558
- Ntambi JM, Miyazaki M (2003).** *Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1.* Corr Opin Lipidol 14:255-261
- Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendzioriski CM, Yandel BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD (2002).** *Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity.* PNAS 99:11482-11486
- Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW (1997).** *Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding.* Diabetes 46:1768-1774

- Odland LM, Heigenhauser GJ, Lopaschuk GD, Spriet LL (1996).** *Human skeletal muscle malonyl-CoA at rest and during prolonged submaximal exercise.* Am J Physiol 270:E541-E544
- Ohira Y, Jiang B, Roy RR, Oganov V, Ilyina-Kakueva E, Marini JF, Edgerton VR (1992).** *Rat soleus muscle fiber responses to 14 days of spaceflight and hindlimb suspension.* J Appl Physiol 73:51S-57S
- Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T (1998).** *Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats.* J Clin Invest 101:1354-1361
- Olefsky JM (2000).** *Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists.* J Clin Invest 106:467-472
- Oshino N, Sato R (1972).** *The dietary control of the microsomal stearoyl CoA desaturation enzyme system in rat liver.* Arch Biochem Biophys 149:369-377
- Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, Jenkins AB, Storlien LH (1997).** *Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action.* Diabetes 46:983-988
- Pan DA, Lillioja S, Milner MR, Kriketos AD, Baur LA, Bogardus C, Storlien LH (1995).** *Skeletal muscle membrane lipid composition is related to adiposity and insulin action.* J Clin Invest 96:2802-2808
- Pendergrass M, Koval J, Vogt C, Yki-Jarvinen H, Izzo P, Pipek R, Ardehali H, Printz R, Granner D, DeFronzo RA, Mandarino LJ (1998).** *Insulin-induced Hexokinase II expression is reduced in obesity and NIDDM.* Diabetes 47, 387-394
- Perseghin G, Scifo P, DeCobelli F, Pagliato E, Battezzati A, Arcelloni C, Vanzulli A, Testolin G, Pozza G, Del Maschio A, Luzzi L (1999).** *Intramyocellular Triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans – A ^1H - ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents.* Diabetes 48:1600-1606
- Poitout V, Robertson R (2002).** *Secondary β -cell failure in type 2 diabetes – a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity.* Endocrinology 143:339-342
- Porksen N, Hollingdal M, Juhl C, Butler P, Veldhuis JD, Schmitz O (2002).** *Pulsatile insulin secretion: Detection, regulation, and role in diabetes.* Diabetes 51, Suppl 1, S245-S254
- Puckett HL, Wiley FH (1932).** *The relation of glycogen to water storage in the liver.* J Biol Chem 96:367-371
- Rahman SM, Dobrzyn A, Dobrzyn P, Lee SH, Miyazaki M, Ntambi JM (2003).** *Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency down-regulates protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle.* PNAS 100:11110-11115
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA (1963).** *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus.* The Lancet April 13:785-789
- Rasmussen BB, Holmbäck UC, Volpi E, Morio-Liondore B, Paddon-Jones D, Wolfe RR (2002).** *Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle.* J Clin Invest 110:1687-1693
- Ravussin E, Smith SR (2002).** *Increased fat intake, impaired fat oxidation and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus.* Ann NY Acad Sci 967:363-378
- Reaven GM (1995).** *Pathophysiology of insulin resistance in human disease.* Physiol Rev 75:473-486

- Reddy J (2001_a).** *Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis III. Peroxisomal β -oxidation, PPAR α , and steatohepatitis.* Am J Gastrointest Liver Physiol 281:G1333-G1339
- Reddy J, Hashimoto T (2001_b).** *Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system.* Annu Rev Nutr 21:193-230
- Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI (1996).** *Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans.* J Clin Invest 97:2859-2865
- Rodriguez JC, Gil-Gomez G, Hegardt FG, Haro D (1994).** *Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids.* J Biol Chem 269:18767-18772
- Rosendal J, Knudsen J (1992).** *A fast and versatile method for extraction and quantitation of long-chain acyl-CoA esters from tissue: Content of individual long chain acyl-CoA esters in various tissues from fed rat.* Analytical Biochemistry 207:63-67
- Ross R, Aru J, Freeman J, Hudson R, Janssen I (2002).** *Abdominal adiposity and insulin resistance in obese men.* Am J Physiol 282:E657-E663
- Ruderman NB, Saha AK, Kraegen EW (2003).** *Minireview: Malonyl-CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity.* Endocrinology 144:5166-5171
- Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, Witters LA (1999).** *Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance.* Am J Physiol 276:E1-E18
- Ryysy L, Häkkinen AM, Goto T, Vehavaara S, Westerbacka J, Halavaara J, Yki-Järvinen H (2000).** *Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients.* Diabetes 49:749-758
- Saddick M, Gamble J, Witters LA, Lopaschuk GD (1993).** *Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart.* J Biol Chem 268:25836-25845
- Saha AK, Kurowski TG, Ruderman NB (1995).** *A malonyl-CoA fuel-sensing mechanism in muscle: effects of insulin, glucose and denervation.* Am J Physiol 269:E283-E289
- Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T, Auwerx J (1995).** *Induction of the acyl-Coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter.* J Biol Chem 270:19269-19267
- Schrauwen-Hinderling VB, Schrauwen P, Hesselink MKC, Engelshoven van JMA, Nicolay K, Saris WHM, Kessels AGH, Kooi ME (2003).** *The increase in intramyocellular lipid content is a very early response to training.* J Clin End & Metab 88:1610-1616
- Seedorf U, Assmann G (2001).** *The role of PPAR α in obesity.* Nutr Metab Cardiovasc Dis 11:189-194
- Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, Halavaara J, Yki-Järvinen H (2002).** *Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men.* J Clin Endocrinol Metab 87:3023-3028

- Shimoike T, Yanase T, Umeda F, Ichino I, Takayanagi R, Nawata H (1998).** *Subcutaneous or visceral adipose tissue expression of the PPAR γ gene is not altered in the fatty (fa/fa) Zucker rat.* Metabolism 47:1494-1498
- Shulman GJ (2000).** *Cellular mechanisms of insulin resistance.* J Clin Invest 106:171-176
- Simoneau JA, Kelley DE (1997).** *Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM.* Am J Physiol 83:166-171
- Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP, Kelley DE (1999).** *Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss.* FASEB J 13:2051-2060
- Sinha R, Dufour S, Petersen KF, LeBon V, Enoksson S, Ma YZ, Savoye M, Rothman DL, Shulman GI, Caprio S (2002).** *Assessment of skeletal muscle Triglyceride content by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy in lean and obese adolescents – Relationships to insulin sensitivity, total body fat, and central adiposity.* Diabetes 51:1022-1027
- Spriet LL, Heigenhauser GJF, Jones NL (1986).** *Endogenous triacylglycerol utilization by rat skeletal muscle during tetanic stimulation.* J Appl Physiol 60:410-415
- Sreenan S, Sturis J, Pugh W, Burant CF, Polonsky KS (1996).** *Prevention of hyperglycemia in the Zucker diabetic fatty rat by treatment with Metformin or troglitazone.* Am J Physiol 271:E742-E747
- Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC (1998).** *Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism.* Circulation 98. 2088-2093
- Stannard SR, Thompson MW, Fairbairn K, Huard B, Sachinwalla T, Thompson CH (2002).** *Fasting for 72 h increases Intramyocellular lipid content in nondiabetic, physically fit men.* Am J Physiol 283:E1185-E1191
- Stettler C, Mueller B, Diem P (2000).** *Was Sie schon lange über das HbA1c wissen wollten.* Schweiz Med Wochenschr 130:993-1005
- Summers SA, Garza LA, Zhou H, Birnbaum MJ (1998).** *Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and akt kinase activity by ceramides.* Mol Cell Biol 18:5457-5464
- Takaya K, Ogawa Y, Isse N, Okazaki T, Satoh N, Masuzaki H, Mori K, Tamura N, Hosada K, Nakao K (1996).** *Molecular Cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs – identification of a missense mutation in Zucker Fatty (fa/fa) Rats.* Biochem Biophys Res Commun 225:75-83
- Tanner CJ, Barakat HA, Dohm GL, Pories WJ, MacDonald KG, Cunningham PRG, Swanson MS, Houmard JA (2002).** *Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss.* Am J Physiol 282:E1191-E1196
- The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus (2002).** *Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus.* Diabetes Care 25, Suppl 1:S5-S20
- Thompson AL, Cooney GJ (2000).** *Acyl-CoA inhibition of Hexokinase in rat and human skeletal muscle is a potential mechanism of lipid-induced insulin resistance.* Diabetes 49:1761-1765
- Turinsky J, O'Sullivan DM, Bayly BP (1990).** *1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo.* J Biol Chem 28:16880-16885
- Unger RH (1995).** *Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications.* Diabetes 44:863-870

- Unger RH, Orci L (2001).** *Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders.* FASEB J 15:312-321
- Upton R, Widdowson PS, Ishii S, Tanaka H, Williams G (1998).** *Improved metabolic status and insulin sensitivity in obese fatty (fa/fa) Zucker rats and Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats treated with Thiazolidindione, MCC-555.* Br J Pharmacol. 125:1708-1714
- Verspohl EJ, Weiland F (2002).** *Der Insulinresistenz entgegen – Insulinsensitizer.* Pharmazie unserer Zeit 3:280-292
- Vessby B, Gustafsson IB, Tengblad S, Boberg M, Andersson A (2002).** *Desaturation and elongation of fatty acids and insulin action.* Ann NY Acad SCI 967:183-195
- Voss MD, Beha A, Jerabek-Sadow G, Tschank G, Gerl M, Quint M, Herling AW, Schaefer HL, Kramer W, Korn M (2003).** *Expression profiling in skeletal muscle of young zucker diabetic fatty rats: implications for a role of stearoyl-CoA desaturase 1 in insulin resistance.* Diabetologia 46,Suppl.2:A 204, 586
- Wakil SJ, Stoops JK, Joshi VC (1983).** *Fatty acid synthesis and its regulation.* Ann Rev Biochem 52:537-579
- Webber J, Taylor J, Greathead H, Dawson J, Buttery PJ (1994).** *Effects of fasting on fatty acid kinetics and on the cardiovascular, thermogenic and metabolic responses to the glucose clamp.* Clinical Science 87:697-706
- Wititsuwannakul D, Kim KH (1977).** *Mechanism of palmitoyl coenzyme A inhibition of liver glycogen synthase.* J Biol Chem 252:7812-7817
- Yasuda K, Nishikawa W, Iwanaka N, Nakamura E, Seino Y, Tsuda K, Ishihara A (2002).** *Abnormality in fibre type distribution of soleus and plantaris muscles in non-obese diabetic Goto-Kakizaki rats.* 29:1001-1008
- Ye JM, Doyle PJ, Iglesias MA, Watson DG, Cooney GJ, Kraegen EW (2001).** *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α activation lowers muscle lipids and improves insulin sensitivity in high fat-fed rats.* Diabetes 50:411-417
- Yokoyama Y, Horikoshi S, Takahashi T, Sato H (2000).** *Low-capacity cation-exchange chromatography of ultraviolet-absorbing urinary basic metabolites using a reversed-phase column coated with hexadecylsulfonate.* J of Chromatography 886:297-302
- Youn JH, Buchanan TA (1993).** *Fasting does not impair insulin-stimulated glucose uptake but alters intracellular glucose metabolism in conscious rats.* Diabetes 42:757-763
- Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI (2002).** *Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle.* J Biol Chem 277:50230-50236
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE (2001).** *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action.* J Clin Invest 108:1167-1174
- Zimmet P (2000).** *Globalisation, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the doomsday scenario be averted?.* J of Internal Medicine 247:301-310
- Zimmet P, Alberti KGMM, Shaw J (2001).** *Global and societal implications of the diabetes epidemic.* Nature 414:782-787
- Zucker L (1965).** *Hereditary obesity in the rat associated with hyperlipidemia.* Ann NY Acad Sci 131:447-58

VII Danksagung

Abschließend möchte ich meinen Dank an all jene aussprechen, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst gilt mein Dank **PD Dr. Andreas W. Herling**, der mir die Anfertigung dieser Arbeit bei der Aventis Pharma Deutschland GmbH ermöglicht hat. Auf seine fachliche Hilfestellung konnte ich mich jederzeit verlassen. Sein unermüdliches Engagement, die Beantwortung aller Fragen und die Denkanstöße bei der Interpretation der Daten ermöglichten eine kontinuierliche und zielgerichtete Arbeitsweise.

Dr. Johanna Kuhlmann war als meine Vorgängerin nicht nur Wegbereiterin bei vielen „organisatorischen“ Angelegenheiten. Während der gesamten Erstellung dieser Arbeit war sie nicht nur für Fachfragen eine absolut unersetzliche Ansprechpartnerin.

Bei **Marion Stein** und **Elke Kleinschmidt** möchte ich mich für die Einarbeitung und für das angenehme Arbeitsklima bedanken. Von der Einführung in den Umgang mit Versuchstieren und den unzähligen praktischen Ratschlägen habe ich bei der Versuchsdurchführung profitiert.

DI Ulrich Belz, PD Dr. Hans-Paul Juretschke, Dr. Claudia Neumann-Häfelin, DI Jürgen Kalisch und **Ute Thoma** danke ich für die intensive Einarbeitung in die ^1H -NMR-Spektroskopie. Diskussionsrunden und kritische Fragen dieser Arbeitsgruppe haben zu immer neuen gedanklichen Ansätzen beigetragen. Mein besonderer Dank gilt dabei Uli Belz für die Einarbeitung und seine wiederholte Tätigkeit als Lektor.

Michael Klebach, DI Manfred Quint, Dr. Martin Gerl, und Ralf Boeff verdanke ich die Einarbeitung in die HPLC-Analytik und die unersetzliche Hilfestellung bei der, manchmal nicht einfachen, Etablierung der Methodik zur LCACoA-Analytik. Mein besonderer Dank gilt dabei Michael Klebach für seine Nachsicht für die durch mich verbreitete Hektik.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern aus **Labor Dr. Gabriele Biemer-Daub, Labor Prof. Dr. Jürgen Sandow** sowie **Labor Dr. Hans-Ludwig Schäfer** für die Analyse unzähliger Blut- und Leberproben.

Bei **Prof. Dr. Michael Roden** möchte ich mich für die Analyse der Fettsäurespezies im Plasma sowie für die im Rahmen dieser wissenschaftlichen Kooperation erfolgten fruchtbaren Gespräche bedanken.

Petra Schneider gilt mein Dank für die liebevolle Betreuung der Versuchstiere und ihr Mitdenken bei den verschiedenen Versuchsprotokollen.

Für das entspannte Arbeitsklima danke ich allen **Mitarbeitern der DG Stoffwechsel!**

Meine Eltern **Franz** und **Bärbel Beha** haben durch ihre Unterstützung während des Studiums und der Anfertigung dieser Dissertation zum Gelingen beigetragen. Danke, dass Ihr mir das ermöglicht habt!

Bei meinem Freund **Steffen Baumann** möchte ich mich für sein kommentarloses Ertragen vieler Geschichten rund um „Palmitoleoyl-CoA“ herzlich bedanken.

VIII Anhang

Die nachfolgenden Resultate wurden im Rahmen der Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel erhoben. Die Analysen erfolgten im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation (Prof. Roden, Wien) sowie durch externe Analysenlabors (LUFA, AMP-Lab GmbH).

VIII.1 Enzymatische Fasertypcharakterisierung verschiedener Skelettmuskeln

Die enzymatische Charakterisierung des Skelettmuskelgewebes erfolgte durch das Analysenlabor „AMP-Lab GmbH“ (Labor für Angewandte Molekulare Physiologie) in Mainz unter Leitung von Prof. Dr. G. Kamp.

Adipöse Menschen haben einen, gegenüber schlanken Individuen, verminderten Anteil an Typ I-Muskelfasern („slow-twitch“, oxidativ) sowie einen erhöhten Anteil an Typ II-Fasern („fast-twitch“, glykolytisch) (TANNER et al, 2002). Des Weiteren ist die oxidative Enzymaktivität der verschiedenen Fasertypen bei obesen Menschen und Typ 2 Diabetikern vermindert (HE et al, 2001). Oxidative Skelettmuskelfasern zeigen bei der Wistar-Ratte eine im Vergleich mit glykolytischen Skelettmuskelfasern erhöhte Insulinsensitivität (JAMES et al, 1985).

Die Analyse der oxidativen Enzymkapazität bei ZDF-Ratten diente dazu, Unterschiede zwischen den schlanken, insulinsensitiven und den obesen, insulinresistenten Ratten aufzudecken, sowie die Literaturangaben zum Fasertyp der verschiedenen Skelettmuskeln für die ZDF-Ratte zu bestätigen.

Die Analysen wurden bei 8 Wochen alten ZDF-Ratten durchgeführt. Die Gruppen bestanden aus je 8 schlanken und obesen Tieren. Die Ratten wurden in gefüttertem Zustand unter Isofluran-Narkose getötet.

Es wurden beiderseits SOL, TIB, EDL, sowie ein Aliquot des LONG zur Analyse entnommen.

Die von AMP-Lab durchgeführte Analyse erfolgte durch photometrische Bestimmung der Extinktionsänderung. Es wurde die Aktivität folgender Enzyme bestimmt:

- Glykogenphosphorylase (GPase) als Marker für die Nutzung von Glykogen
- Hexokinase (HK) als Marker für den Glukosemetabolismus
- Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) als Marker für die Glykolyse
- β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (HOADH) als Marker für die Fettoxidation in den Mitochondrien

VIII.1.a Ergebnisse

Die glykolytische Aktivität im SOL war deutlich niedriger als in den übrigen untersuchten Skelettmuskeln. Sie war bei den obesen ZDF-Ratten im SOL gegenüber den schlanken Tieren signifikant erhöht.

Die Kapazität zur Lipidoxidation war im SOL höher als in den anderen untersuchten Skelettmuskeln (Abb. VIII.1.1-1).

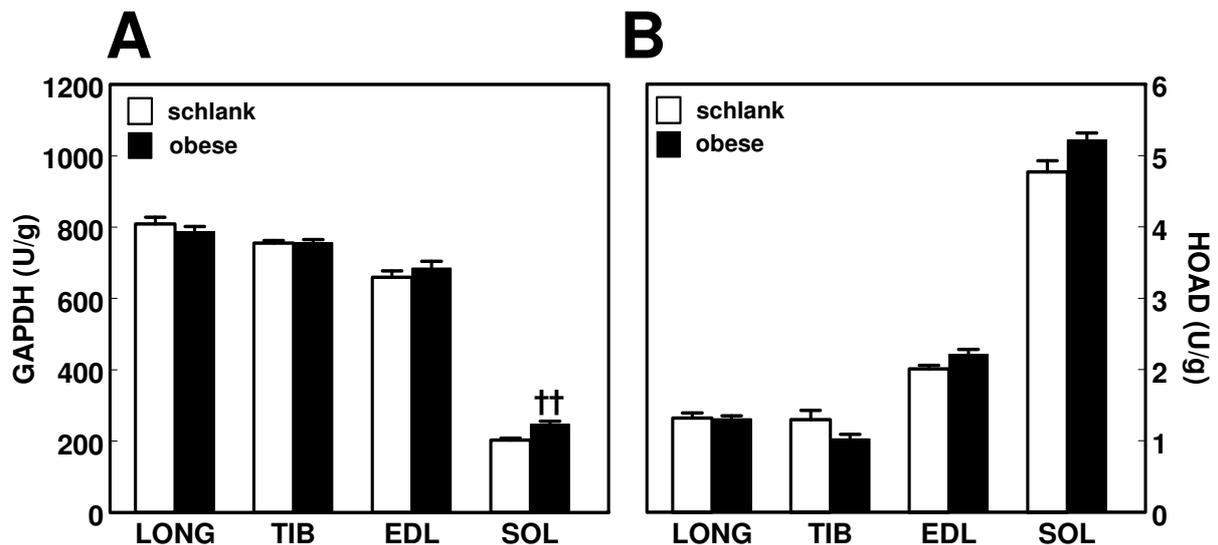


Abb. VIII.1.1-1 Enzymaktivitäten in M. Longissimus Dorsi (LONG), M. Tibialis Anterior (TIB), M. Extensor Digitorum Longus (EDL) und M. Soleus (SOL) 8 Wochen alter schlanker und obeser ZDF-Ratten (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; $\dagger\dagger$ $p < 0,001$ vs. schlank).

A: GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase)
 B: HOAD (β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase)

Der SOL zeigte eine gegenüber den anderen Skelettmuskeltypen verminderte Glykogenphosphorylaseaktivität. Die Aktivität dieses Enzyms war in allen untersuchten Skelettmuskeln bei den obesen Tieren signifikant höher als bei den schlanken Ratten.

Die HK-Aktivität war im SOL am höchsten. Bei den obesen Ratten war die Aktivität dieses Enzyms in allen untersuchten Skelettmuskeln geringer als bei den schlanken Tieren (Abb. VIII.1.1-2).

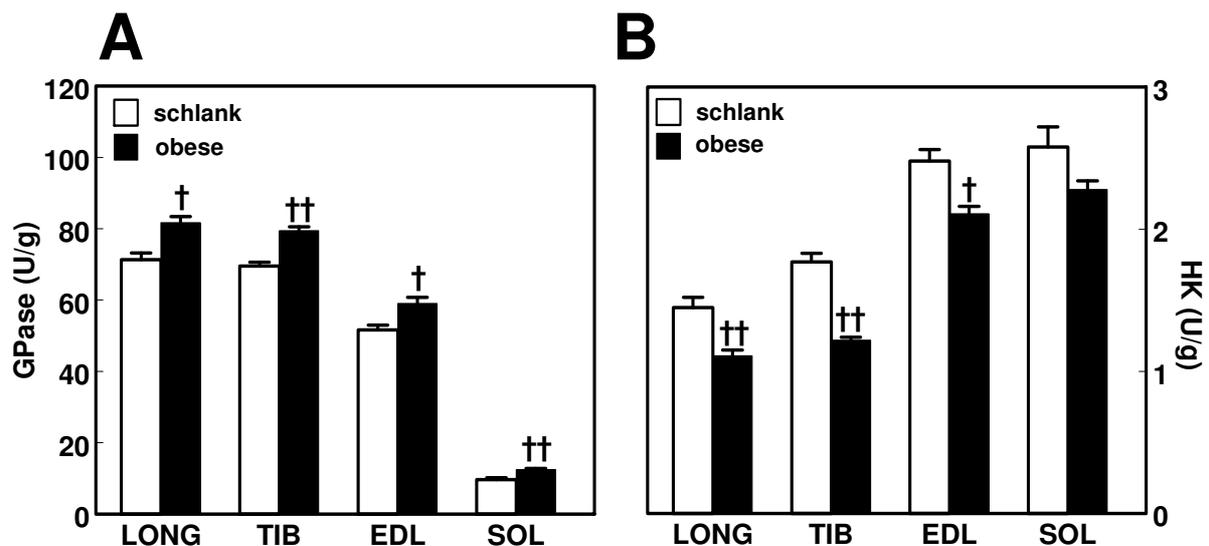


Abb. VIII.1.1-2 Enzymaktivitäten in M. Longissimus Dorsi (LONG), M. Tibialis Anterior (TIB), M. Extensor Digitorum Longus (EDL) und M. Soleus (SOL) 8 Wochen alter schlanker und obeser ZDF-Ratten (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; \dagger $p < 0,05$ vs. schlank, $\dagger\dagger$ $p < 0,001$ vs. schlank).

A: GPase (Glykogenphosphorylase)
B: HK (Hexokinase)

LONG und TIB waren sich hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivitäten sehr ähnlich. Beide hatten eine hohe glykolytische Aktivität und geringe Kapazität zur Lipidoxidation, was als Indikator für einen hohen Anteil an „fast-twitch“-Fasern bei diesen Muskeltypen gewertet werden kann. SOL hingegen wies eine geringe glykolytische Kapazität sowie eine hohe Kapazität zur Lipidoxidation auf. Dies spricht für einen hohen Anteil an „slow-twitch“-Fasern. EDL nahm eine Zwischenstellung ein und unterschied sich signifikant von den drei anderen Muskeltypen.

Das Verhältnis von Glykogenphosphorylase zu HK war bei den obesen Tieren in allen 4 Muskeltypen signifikant erhöht, was für eine erhöhte Glukoseverfügbarkeit in der Skelettmuskelzelle spricht (Abb. VIII.1.1-3).

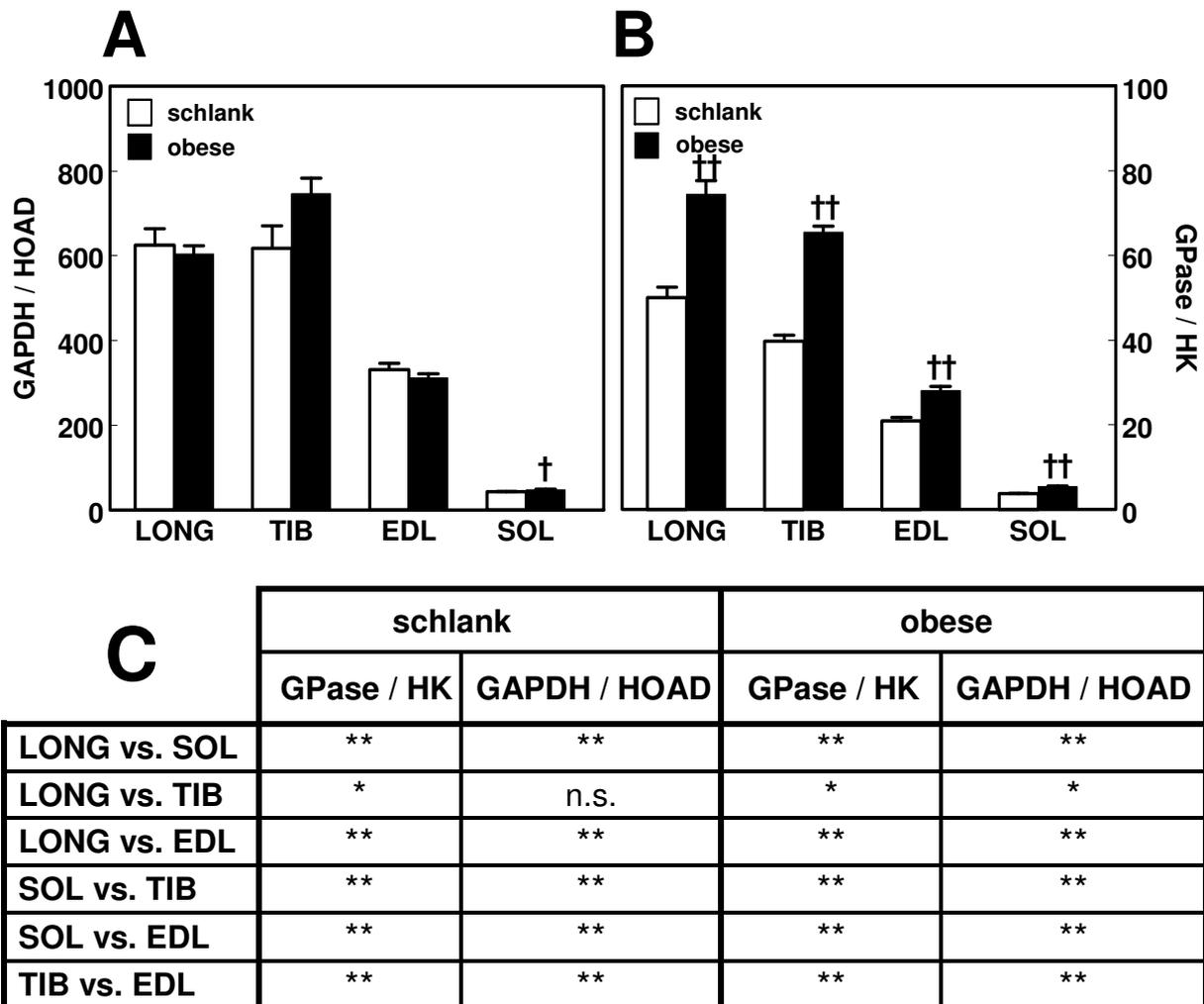


Abb. VIII.1.1-3 Verhältnisse von Enzymaktivitäten in M. Longissimus Dorsi (LONG), M. Tibialis Anterior (TIB), M. Extensor Digitorum Longus (EDL) und M. Soleus (SOL) 8 Wochen alter schlanker und obese ZDF-Ratten (Werte sind Mittelwerte \pm SEM; \dagger $p < 0,05$ vs. schlank, $\dagger\dagger$ $p < 0,001$ vs. schlank).

A: Verhältnis von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) zu HOAD (β -Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase)

B: Verhältnis von GPase (Glykogenphosphorylase) zu HK (Hexokinase)

C: Statistische Bewertung der enzymatischen Unterschiede der 4 Muskeltypen (n.s. nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$)

VIII.2 Bestimmung der Fettsäurespezies im Rattenfutter

Die Bestimmung des Lipidprofils im Rattenfutter wurde vom Analysenlabor der „Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt“ (LUFA) in Kiel, unter Leitung von Dr. H. Wehage gaschromatographisch durchgeführt.

Das Fettsäuremuster im Futter entspricht dem exogen über die Nahrung zugeführten Fettsäuremuster der Ratten und liefert, im Vergleich mit den

Konzentrationen der einzelnen Fettsäurespezies in den untersuchten Geweben, Hinweise auf endogene Fettsäuresynthese, Elongation und Desaturierung.

VIII.2.a Ergebnisse

Das Rattenfutter hatte einen Gesamt-Rohfettgehalt von 3%. Der Anteil an Linolsäure (C18:2) betrug dabei 56%; Palmitat (C16:0) und Ölsäure (C18:1) waren zu jeweils 16 - 17% im Futter enthalten. Als weitere Fettsäuren waren in geringeren Mengen Linolensäure (C18:3), Stearinsäure (C18:0), Eicosensäure (C20:1), Behensäure (C22:0), Docosensäure (C22:1), Tetracosensäure (C24:0), Arachinsäure (C20:0) und Palmitoleinsäure (C16:1) vorhanden (Tab. VIII.2.a-1).

Fettsäure		$\mu\text{mol/g}$ Futter	%
Palmitat	C16:0	17,54	16,5
Palmitoleinsäure	C16:1	0,23	0,2
Margarinsäure	C17:0	n.b.	0,1
Stearinsäure	C18:0	2,41	2,4
Ölsäure	C18:1	15,96	16,1
Linolsäure	C18:2	52,14	56,0
α - + γ -Linolensäure	C18:3	5,97	6,4
Octadecatetraensäure	C18:4	n.b.	n.b.
Arachinsäure	C20:0	0,26	0,3
Eicosensäure	C20:1	0,46	0,5
Eicosadiensäure	C20:2	n.b.	0,1
Eicosatriensäure	C20:3	n.b.	n.b.
Arachidonsäure	C20:4	n.b.	n.b.
Eicosapentaensäure	C20:5	n.b.	n.b.
Behensäure	C22:0	0,27	0,3
Docosensäure	C22:1	0,26	0,2
Docosapentaensäure	C22:5	n.b.	n.b.
Docosahexaensäure	C22:6	n.b.	n.b.
Tetracosansäure	C24:0	0,22	0,3
Nervonsäure	C24:1	n.b.	0,1
Summe		95,72	

Tab. VIII.2.a-1 Lipidspezies im Rattenfutter
(n = 1 Futterprobe, n.b.: Konzentration unter Bestimmungsgrenze).

VIII.3 Analyse der Lipidspezies im Fettgewebe

Die Bestimmung der Lipidspezies im Fettgewebe wurde vom Analysenlabor der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt (LUFA) in Kiel unter Leitung von Dr. Hubert Wehage gaschromatographisch durchgeführt.

Der Organismus bezieht seine Energie postabsorptiv hauptsächlich aus der adipozytären Lipolyse.

Es wurden sowohl Proben von viszeralem (visz.) als auch von subkutanem (s.c.) Fettgewebe analysiert, da viszerale, nicht jedoch subkutane Adipositas beim Menschen mit Insulinresistenz korreliert (ROSS et al, 2002; BROCHU et al, 2000).

VIII.3.1 Fettgewebsanalyse bei 16 Wochen alten Wistar-Ratten

Für diese Analyse wurden Proben von je 8 Tiere im gefütterten Zustand sowie nach einer 72-stündigen postabsorptiven verwendet.

VIII.3.1.a Ergebnisse

Das Fettgewebe der Wistar-Ratten enthielt sowohl im gefütterten Zustand als auch nach einer 72-stündigen postabsorptiven Phase in hohen Konzentrationen (> 300 $\mu\text{mol} / \text{g}$ Fettgewebe) Linolsäure (C18:2), Ölsäure (C18:1) und Palmitat (C16:0). In geringeren Konzentrationen (> 30 und < 100 $\mu\text{mol/g}$ Fettgewebe) waren Palmitoleinsäure (C16:1), Linolensäure (C18:3), und Stearinsäure (C18:0) vorhanden. In Konzentrationen zwischen 4 und 30 $\mu\text{mol} / \text{g}$ Fettgewebe wurden Arachidonsäure (C20:4), Eicosensäure (C20:1), Eicosatriensäure (C20:3), Docosapentaensäure (C22:5) und Docosahexaensäure (C22:6) nachgewiesen.

Da das subkutane Fettgewebe mit Bindegewebe durchsetzt war, enthielt dieses insgesamt weniger Fett als das viszerale Fettgewebe. Die Anteile der einzelnen Fettsäuren im subkutanen Fett unterschieden sich nur in Einzelfällen von den Anteilen im viszeralen Fettgewebe.

Die Palmitatkonzentration (C16:0) war postabsorptiv im viszeralen Fettgewebe verringert. Ebenso verringerte sich postabsorptiv die Konzentration von Palmitoleinsäure (C16:1), Linolensäure (C18:3) und Arachidonsäure (C20:4) im viszeralen Fettgewebe signifikant. Im subkutanen Fettgewebe war postabsorptiv eine signifikante Verringerung der Linolensäurekonzentration (C18:3) zu finden (Tab. VIII.3.1.a-1).

Fettsäure- spezies	µmol/g Fettgewebe			
	gefüttert		72 h postabsorptiv	
	s.c.	visz.	s.c.	visz.
Palmitat C16:0	391±31	583±10	334±13	486±33*
Palmitoleinsäure C16:1	48,6±6,4	93,3±7,2	35,6±7,3	62,6±6,0*
Margarinsäure C17:0	5,2±0,3	7,3±0,2	5,0±0,3	6,8±0,4
Stearinsäure C18:0	53,0±3,6	95,1±14,7	55,2±3,6	66,0±3,9
Ölsäure C18:1	444±29	580±26	418±17	566±37
Linolsäure C18:2	712±44	1055±37	678±40	946±54
α- + γ-Linolensäure C18:3	45,9±3,5	81,9±2,2	32,1±2,1*	58,5±4,2**
Octadecatetraensäure C18:4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Arachinsäure C20:0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Eicosensäure C20:1	9,4±0,8	12,1±0,4	10,7±0,9	12,8±0,9
Eicosadiensäure C20:2	6,3±0,3	10,7±0,4	6,4±0,5	10,1±0,6
Eicosatriensäure C20:3	n.b.	6,8±0,3	n.b.	5,7±0,4
Arachidonsäure C20:4	14,4±1,9	30,4±2,0	12,5±0,6	22,0±1,7*
Eicosapentaensäure C20:5	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Behensäure C22:0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Docosensäure C22:1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Docosapentaensäure C22:5	n.b.	5,0±0,4	n.b.	4,0±0,3
Docosahexaensäure C22:6	3,4±0,2	7,2±0,7	4,2±1,0	5,8±0,5
Tetracosansäure C24:0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Nervonsäure C24:1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Summe	1733±113	2568±47	1588±67	2252±139[†]

Tab. VIII.3.1.a-1 Lipidspezies im subkutanen (s.c.) und viszeralen (visz.) Fettgewebe 16 Wochen alter Wistar-Ratten im gefütterten Zustand sowie nach einer 72-stündigen postabsorptiven Periode (Werte sind Mittelwerte ± SEM; n=8; * p<0,05 vs. gefüttert; ** p<0,001 vs. gefüttert; n.b: Konzentration unter Nachweisgrenze).

VIII.3.2 Fettgewebsanalyse bei 8 Wochen alten ZDF-Ratten

Für diese Analyse wurden 8 Wochen alte, gefütterte Tiere verwendet. Die Gruppen setzten sich aus 8 schlanken und 8 obesen Tieren zusammen.

VIII.3.2.a Ergebnisse

Sowohl das subkutane als auch das viszerale Fettgewebe bestand bei beiden Tiergruppen mit Mengen $>300 \mu\text{mol} / \text{g}$ hauptsächlich aus Palmitat (C16:0), Ölsäure (C18:1) und Linolsäure (C18:2). Bei den obesen Tieren nahm die Palmitoleinsäure (C16:1) mit $> 200 \mu\text{mol} / \text{g}$ Fett ebenfalls einen großen Anteil ein. In Konzentrationen von > 10 und $< 150 \mu\text{mol} / \text{g}$ Fettgewebe waren Margarinsäure (C17:0), Stearinsäure (C18:0), Linolensäure (C18:3), Eicosensäure (C20:1), Arachidonsäure (C20:4) und Docosahexaensäure (C22:6) vorhanden. Eicosadiensäure (C20:2), Eicosatriensäure (C20:3), Eicosapentaensäure (C20:5) und Docosapentaensäure (C22:5) waren in Konzentrationen von $< 10 \mu\text{mol} / \text{g}$ Fettgewebe zu finden.

Da das subkutane Fettgewebe mit Bindegewebe durchsetzt war, enthielt dieses insgesamt weniger Fett als das viszerale Fettgewebe. Die Zusammensetzung des subkutanen Fettgewebes unterschied sich nur in Einzelfällen von derjenigen des viszeralen Fettes.

Die obesen Ratten wiesen einen gegenüber den schlanken Tieren signifikant erhöhten Anteil an Palmitat (C16:0), Palmitoleinsäure (C16:1), Stearinsäure (C18:0) und Ölsäure (C18:1) auf (Tab. VIII.3.2.a-1).

Fettsäure- spezies	µmol/g Fettgewebe			
	schlank		obese	
	s.c.	visz.	s.c.	visz.
Palmitat C16:0	388±11	661±13	889±25 ^{††}	984±8 ^{††}
Palmitoleinsäure C16:1	51,8±2,2	121±16	237±9 ^{††}	246±3 ^{††}
Margarinsäure C17:0	9,8±0,4	12,8±0,5	12,8±1,1 [†]	11,1±0,3 [†]
Stearinsäure C18:0	92,3±3,7	115±5	102±3 [†]	126±1 [†]
Ölsäure C18:1	563±20	860±33	924±28 ^{††}	989±7 [†]
Linolsäure C18:2	402±14	636±19	426±13	409±5 ^{††}
α- + γ-Linolensäure C18:3	24,4±1,1	43,4±1,2	32,8±1,0 ^{††}	32,0±0,4 ^{††}
Octadecatetraensäure C18:4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Arachinsäure C20:0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Eicosensäure C20:1	10,1±0,4	15,3±0,6	10,7±0,3	11,2±0,2 ^{††}
Eicosadiensäure C20:2	4,1±0,1	6,6±0,2	4,7±0,2 [†]	4,4±0,3 ^{††}
Eicosatriensäure C20:3	n.b.	5,1±0,2	3,9±0,2	4,5±0,2 [†]
Arachidonsäure C20:4	13,5±0,8	26,8±1,0	13,9±0,5	13,0±0,3 ^{††}
Eicosapentaensäure C20:5	n.b.	5,5±0,3	4,2±0,1	4,2±0,1 ^{††}
Behensäure C22:0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Docosensäure C22:1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Docosapentaensäure C22:5	n.b.	7,1±0,3	5,8±0,2	7,0±0,1
Docosahexaensäure C22:6	5,9±0,4	19,3±1,1	11,6±0,4 ^{††}	14,8±0,2 [†]
Tetracosansäure C24:0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Nervonsäure C24:1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Summe	1563±50	2529±73	2666±77^{††}	2852±17^{††}

Tab. VIII.3.2.a-1 Lipidspezies im subkutanen (s.c.) und viszeralen (visz.) Fettgewebe 8 Wochen alter, gefütterter ZDF-Ratten (Werte sind Mittelwerte ± SEM; n=8; † p<0,05 vs. schlank; †† p<0,001 vs. schlank; n.b: Konzentration unter Nachweisgrenze).

VIII.4 Bestimmung der Fettsäurespezies der FFS im Plasma

Die Analyse der Fettsäurespezies im Plasma wurde in der Universitäts-Klinik für Innere Medizin III in Wien, unter Leitung von Univ.-Prof. Dr. M. Roden mittels Gaschromatographie durchgeführt.

Die Proben (EDTA-Plasma) wurden zur Hemmung der Lipolyse mit Xenical[®] (Orlistat, Roche Pharmaceuticals, Nutley, USA) in einer Konzentration von 1 µg / ml Plasma versetzt.

Die Fettsäuren aus der adipozytären Lipolyse erscheinen im Blut in der Fraktion der FFS. Um die bei der Lipolyse im Fettgewebe freiwerdenden Fettsäuren weiter zu verfolgen, wurde die Analyse der Fettsäurespezies in dieser Fraktion des Blutes bestimmt.

VIII.4.1 Bestimmung der Fettsäurespezies im Plasma bei 16 Wochen alten Wistar-Ratten

Für die Analyse wurden Plasmaproben von 4 Tieren aus Versuch II.2.1.b verwendet.

VIII.4.1.a Ergebnisse

Das Fettsäuremuster im Plasma wurde dominiert von Palmitat (C16:0), Ölsäure (C18:1 (n-9)) sowie Linolsäure (C18:2). In deutlich geringeren Mengen konnten Stearinsäure (C18:0), Arachidonsäure (C20:4), Palmitoleinsäure (C16:1), Vaccensäure (C18:1 (n-7)) sowie α - und γ -Linolensäure (C18:3 (n-3) und C18:3 (n-6)) nachgewiesen werden. Alle anderen gemessenen Fettsäuren waren in Konzentrationen von weniger als 2 nmol / ml vorhanden.

Während der postabsorptiven Phase nahm der Gesamt-Gehalt an FFS im Plasma zu. Dabei kam es zu einem Anstieg aller gemessenen Fettsäurespezies.

Bei Anfütterung am fünften Versuchstag nahm die Konzentration aller analysierten Fettsäuren im Plasma ab (Tab. VIII.4.1.a-1).

Fettsäurespezies	Dauer der postabsorptiven Phase nmol/ml				
	gefüttert	24h	48h	72h	angefüttert
C16:0	50,2±3,0	79,8±6,6	66,5±5,2	75,4±13,5	18,8±6,5*
C16:1	5,9±1,0	12,1±3,5	7,8±1,2	8,8±1,8	1,7±0,5
C18:0	11,2±0,3	14,5± 1,3	12,2±0,5	14,8±1,6	7,8±2,5
C18:1 (n-7)	5,5±0,2	9,8±1,0*	6,9±0,5	8,6±1,5	1,9±0,8
C18:1 (n-9)	33,7±3,0	59,1±5,1*	46,6±2,3	54,0±11,4	13,9±3,9
C18:2	60,7±3,8	113±12*	82,9±5,5	99,3±21,5	18,2±9,0
C18:3 (n-3)	3,6±0,3	5,7±0,7	4,0±0,4	5,3±1,3	1,1±0,4
C18:3 (n-6)	0,7±0,1	0,7±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1	0,5±0,4
C20:0	0,1±0,1	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,1
C20:1	0,4±0,1	0,4±0,0	0,4±0,0	0,5±0,0	0,3±0,0
C20:2	0,9±0,1	1,2±0,1	0,9±0,1	1,4±0,2	0,4±0,1
C20:3	0,3±0,1	0,3±0,0	0,2±0,0	0,2±0,1	0,1±0,1*
C20:4	7,5±0,7	10,3±0,9	6,9±0,9	9,8±2,0	3,6±1,4
C20:5	0,2±0,1	0,3±0,0	0,2±0,1	0,1±0,1	n.b.
C22:0	n.b.	0,1±0,1	n.b.	n.b.	0,2±0,1
C22:1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
C22:4	1,8±0,3	1,7±0,2	1,2±0,2	2,4±0,3	0,6±0,3*
C22:5	0,4±0,2	0,6±0,1	0,5±0,1	1,0±0,2	0,2±0,2
C22:6	1,6±0,2	2,3±0,4	1,7±0,3	2,0±0,3	0,7±0,5
C24:0	n.b.	0,8±0,1	0,3±0,1	n.b.	0,4±0,3
C24:1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Summe	188±9	319±26*	245±16	290±55	72,2±25,7

Tab. VIII.4.1.a-1 Dynamik verschiedener Fettsäurespezies im Plasma 16 Wochen alter Wistar-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte ± SEM; * p<0,05 vs. gefüttert; ** p<0,001 vs. gefüttert; intraindividuelle Studie; n.b.: Konzentration unter Bestimmungsgrenze; n=4).

VIII.4.2 Bestimmung der Fettsäurespezies im Plasma bei 8 Wochen alten obesen ZDF-Ratten

Für die Analyse wurden Plasmaproben von 4 obesen Tieren aus Versuch II.2.2.b verwendet.

VIII.4.2.a Ergebnisse

Die Summe aller im Plasma gemessenen Fettsäuren stieg bei den obesen Tieren im Verlauf der postabsorptiven Phase deutlich an. Diese Erhöhung der FFS wurde vor allem durch den Anstieg von Palmitat (C16:0), Ölsäure (C18:1 (n-9)), Linolsäure (C18:2) und Palmitoleinsäure (C16:1) verursacht. Die genannten Fettsäuren dominierten quantitativ das Fettsäurespektrum über den gesamten Versuchszeitraum hinweg. Die übrigen gemessenen Fettsäuren waren postabsorptiv ebenfalls erhöht.

Bei Anfütterung am fünften Versuchstag sank der Blutspiegel an FFS unter den Ausgangswert ab. Alle gemessenen Fettsäuren zeigten die gleiche Dynamik eines Anstiegs während der postabsorptiven Phase sowie des Absinkens bei Wiederanfütterung (Tab. VIII.4.2.a-1).

Fettsäure- spezies	Dauer der postabsorptiven Phase nmol/ml				
	gefüttert	24h	48h	72h	angefüttert
C16:0	80,4±12,8	90,7±21,6	158±18*	132±19	33,6±8,4
C16:1	12,5±1,3	15,0±7,4	49,0±7,0*	37,7±8,0	8,5±3,2
C18:0	16,7±2,1	16,0±3,5	20,3±1,5	19,3±1,7	6,0±1,0*
C18:1 (n-7)	7,2±0,6	5,6±2,1	10,6±1,0	9,6±1,7	2,3±0,6*
C18:1 (n-9)	43,8±6,8	39,9±15,1	88,3±6,9*	79,8±13,9	19,3±4,3
C18:2	43,1±2,8	29,7±9,3	58,8±5,9	52,3±8,7	16,8±3,0*
C18:3 (n-3)	2,9±0,3	2,0±0,8	4,7±0,4	3,6±0,7	1,2±0,2
C18:3 (n-6)	0,3±0,2	0,2±0,1	1,0±0,1*	0,4±0,2	n.b.
C20:0	0,2±0,1	0,2±0,1	n.b.	n.b.	n.b.
C20:1	0,5±0,0	0,1±0,1*	0,4±0,1	0,5±0,1	0,1±0,1*
C20:2	0,6±0,1	0,6±0,3	1,1±0,2	0,9±0,2	0,1±0,1
C20:3	0,4±0,0	0,3±0,1	0,4±0,1	0,4±0,1	0,1±0,1*
C20:4	9,7±1,4	6,3±2,4	9,4±0,9	8,6±0,9	2,5±0,2*
C20:5	0,4±0,2	0,5±0,3	0,9±0,1	0,6±0,2	0,1±0,1
C22:0	0,2±0,1	0,2±0,1	n.b.	n.b.	0,2±0,1
C22:1	0,1±0,1	0,1±0,1	n.b.	n.b.	n.b.
C22:4	0,7±0,2	1,4±0,5	1,8±0,4	1,6±0,3	0,4±0,1
C22:5	n.b.	1,0±0,6	1,7±0,2	1,4±0,2	0,3±0,1
C22:6	3,7±0,8	3,5±1,8	5,0±0,1	1,3±1,2	n.b.
C24:0	1,1±0,2	0,2±0,2**	n.b.	0,1±0,1**	n.b.
C24:1	0,5±0,3	0,3±0,2	0,1±0,1	n.b.	n.b.
Summe	228±22	221±58	427±44*	361±57	95±22

Tab. VIII.4.2.a-1 Dynamik verschiedener Fettsäurespezies im Plasma 8 Wochen alter obeser ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte ± SEM; * p<0,05 vs. gefüttert; ** p<0,001 vs. gefüttert; interindividuelle Studie; n.b.: Konzentration unter Bestimmungsgrenze; n=4).

VIII.4.3 Bestimmung der Fettsäurespezies im Plasma bei 16 Wochen alten ZDF-Ratten

Für die Analyse wurden Plasmaproben von je 4 schlanken und obesen Tieren aus Versuch II.2.3.b verwendet.

VIII.4.3.a Ergebnisse

Das Fettsäuremuster wurde auch bei diesen Tieren von Palmitat (C16:0), Ölsäure (C18:1) und Linolsäure (C18:2) dominiert. In der postabsorptiven Phase erhöhte sich bei den schlanken Tieren die Summe der FFS signifikant, während bei den obesen Ratten nur tendenziell ein Anstieg zu erkennen war.

Postabsorptiv stiegen alle gemessenen Fettsäurespezies gleichermaßen an (Tab. VIII.4.3.a-1 und VIII.4.3.a-2).

Fettsäure-Spezies		Dauer der postabsorptiven Phase nmol/ml				
		gefüttert	24h	48h	72h	angefüttert
C16:0	schlank	47,9±2,7	93,0±15,4*	109±3**	112±3**	21,2±1,0
	obese	63,6±5,0	89,1±16,8	102±11	106±9	52,9±7,3 [†]
C16:1	schlank	4,4±0,1	13,5±3,9*	15,9±1,9*	15,5±1,4*	0,6±0,4
	obese	5,5±0,7	13,9±4,0	18,3±2,1*	18,7±1,6*	14,0±1,8 ^{††}
C18:0	schlank	12,3±0,4	21,7*±2,4	30,1±2,9**	26,7±1,1**	5,6±0,9
	obese	16,3±0,5	19,9±2,0	20,6±1,7 ^{††}	18,6±0,8 [†]	8,0±0,9*
C18:1 (n-7)	schlank	5,0±0,2	9,2±1,7*	12,1±0,3**	12,2±0,2**	1,9±0,2*
	obese	5,0±0,2	7,9±1,6	9,4±0,7* [†]	10,4±0,5*	4,2±0,6
C18:1 (n-9)	schlank	33,0±1,2	74,8±13,0*	103±5**	100±3**	13,9±1,3
	obese	31,7±1,8	57,2±10,2	68,6±7,3* ^{††}	75,4±5,0* [†]	28,7±3,9
C18:2	schlank	53,0±3,2	87,7*±15,2	105±4**	110±3**	20,2±1,1*
	obese	66,1±5,7	53,4±8,4 ^{††}	58,0±4,7 ^{††}	65,2±4,8 ^{††}	29,3±4,0*
C18:3 (n-3)	schlank	2,3±0,2	4,2±0,8	5,6±1,5	4,7±0,7	0,9±0,1
	obese	4,7±0,5 [†]	2,8±0,6*	3,0±0,2 [†]	3,4±0,3	2,1±0,3*
C18:3 (n-6)	schlank	n.b.	2,5±1,6	0,2±0,2	0,3±0,3	n.b.
	obese	0,7±0,1	0,8±0,1	0,4±0,2	1,4±0,9	0,3±0,2

Tab. VIII.4.3.a-1 Dynamik verschiedener Fettsäurespezies im Plasma 16 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte ± SEM; * p<0,05 vs. gefüttert; ** p<0,001 vs. gefüttert; † p<0,05 vs. schlank; †† p<0,001 vs. schlank interindividuelle Studie; n.b.: Konzentration unter Bestimmungsgrenze ;n=4).

Fettsäure-Spezies		Dauer der postabsorptiven Phase				
		gefüttert	24h	48h	72h	angefüttert
C20:0	schlank	n.b.	1,1±1,1	0,1±0,1	n.b.	n.b.
	obese	0,4±0,1	0,3±0,1	0,2±0,1	0,1±0,1	0,1±0,1
C20:1	schlank	0,2±0,1	0,4±0,1	1,7±1,2	0,3±0,2	n.b.
	obese	0,5±0,1	0,5±0,1	0,5±0,0	0,5±0,1	0,2±0,1
C20:2	schlank	0,6±0,2	1,0±0,1	2,3±1,2	0,9±0,3	n.b.
	obese	0,8±0,0	0,8±0,1	0,7±0,1 [†]	0,9±0,1	0,2±0,1*
C20:3	schlank	n.b.	1,0±0,8	0,1±0,1	n.b.	n.b.
	obese	0,6±0,0	0,5±0,1	0,3±0,1 [†]	0,4±0,1	0,1±0,1*
C20:4	schlank	5,8±0,3	9,4±1,0	11,3±2,2*	9,3±0,9	2,6±0,2
	obese	9,0±0,6	9,8±1,0	9,5±0,9	7,9±0,7	5,1±1,0*
C20:5	schlank	n.b.	1,2±0,9	0,1±0,1	0,2±0,2	n.b.
	obese	0,2±0,1	0,3±0,1	0,2±0,1	0,1±0,1	0,1±0,1
C22:0	schlank	n.b.	n.b.	1,0±1,0	n.b.	n.b.
	obese	0,6±0,2	0,1±0,1*	0,1±0,1*	n.b.	0,3±0,1
C22:1	schlank	n.b.	0,7±0,7	n.b.	n.b.	n.b.
	obese	n.b.	n.b.	n.b.	0,1±0,1	0,8±0,3
C22:4	schlank	1,5±0,3	1,4±0,1	3,7±1,8	1,9±0,2	0,7±0,5
	obese	1,8±0,0	2,2±0,2	1,7±0,1 [†]	1,0±0,4	0,4±0,3*
C22:5	schlank	0,5±0,3	1,0±0,2	1,7±1,2	0,6±0,3	n.b.
	obese	0,9±0,1	1,2±0,1	0,5±0,3	0,8±0,1	0,2±0,2
C22:6	schlank	n.b.	1,6±1,5	2,8±1,0	2,8±1,0	0,1±0,1
	obese	2,6±0,0	3,3±0,3	3,2±0,4	2,7±0,3	1,4±0,4
C24:0	schlank	0,9±0,3	2,4±0,8	0,1±0,1	n.b.	n.b.
	obese	1,0±0,2	0,7±0,1 ^{††}	0,4±0,2	0,1±0,1*	0,3±0,3
C24:1	schlank	n.b.	0,1±0,1	1,0±0,8	n.b.	n.b.
	obese	1,1±0,3	n.b.	0,2±0,2*	0,1±0,1*	0,4±0,1*
Summe	schlank	172±9	339±56*	416±23**	407±8**	69,3±4,2
	obese	217±13	269±46	303±28 [†]	321±21 [†]	153±19 [†]

Tab. VIII.4.3.a-2 Dynamik verschiedener Fettsäurespezies im Plasma 16 Wochen alter ZDF-Ratten während der 72-stündigen postabsorptiven Phase sowie im gefütterten Zustand und nach 24-stündiger Wiederanfütterung der Tiere (Werte sind Mittelwerte ± SEM; * p<0,05 vs. gefüttert; ** p<0,001 vs. gefüttert; † p<0,05 vs. schlank; †† p<0,001 vs. schlank interindividuelle Studie; n.b.: Konzentration unter Bestimmungsgrenze ;n=4).

VIII.5 Anteile der Fettsäurespezies in verschiedenen Geweben und im Futter

Um unterschiedliche Anteile der einzelnen Fettsäuren in den verschiedenen Geweben deutlich zu machen, wurde die Summe der Fettsäuren (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 und C20:4) gebildet und der Anteil der jeweiligen Fettsäure an dieser Summe errechnet.

Die unterschiedlichen Anteile der Fettsäurespezies an den Gesamt-Fettsäuren geben Hinweise auf endogene Elongation und Desaturierung. Die mikrosomale Fettsäuredesaturierung wird unter anderem von Insulin reguliert (PAN et al, 1995; MIMOUNI et al, 1992; ECK et al, 1979).

Die Darstellungen umfassen sowohl den Anteil der jeweiligen Fettsäure bei gefütterten Tieren, als auch Veränderungen dieses Anteils im Verlauf der postabsorptiven Phase. Für letztere Abbildungen wurde exemplarisch der Wert nach 48-stündiger Nahrungskarenz gewählt.

VIII.5.1 Palmitat (C16:0)

Der Fettanteil des Rattenfutters bestand zu ca. 20% aus Palmitat. Im Blut war Palmitat in höherer Konzentration vorhanden. Der Anteil von Palmitat an den Gesamt-LCACoA in Leber und Muskulatur entsprach dem im Futter. Im Fettgewebe war Palmitat in höherer Konzentration vorhanden als im Futter.

Der Anteil von Palmitat im Fettgewebe der 8 Wochen alten obesen Ratten war, gegenüber den schlanken ZDF-Ratten, erhöht (Abb. VIII.5.1-1).

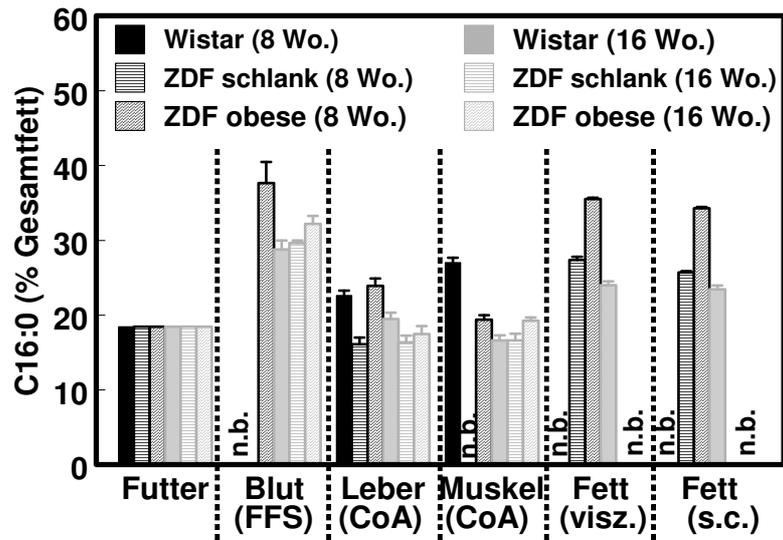


Abb. VIII.5.1-1 Anteil von Palmitat an der Summe der Fettsäuren in verschiedenen Geweben gefütterter Tiere sowie im Futter (Werte sind Mittelwert \pm SEM; n.b.: es liegen keine Daten vor).

Während der postabsorptiven Phase blieb der Anteil von Palmitat in den untersuchten Geweben annähernd konstant (Abb. VIII.5.1-2).

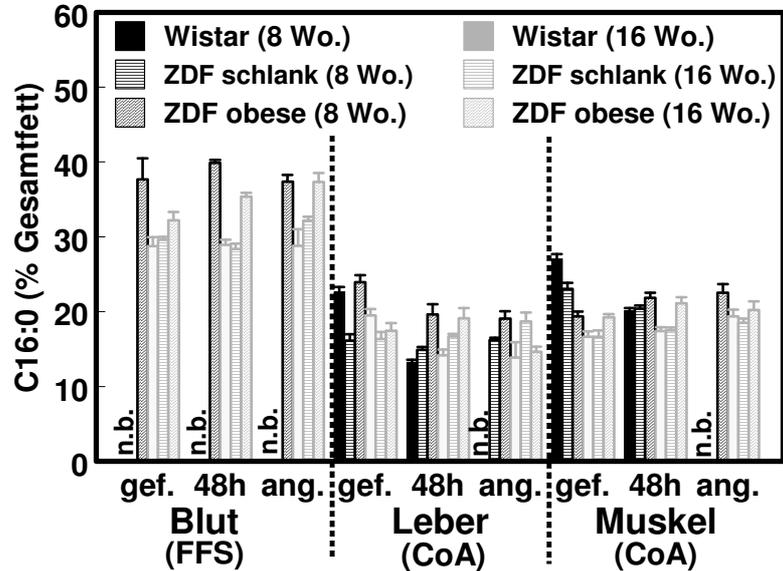


Abb. VIII.5.1-2 Anteil von Palmitat an der Summe der Fettsäuren in verschiedenen Geweben während der Hungerphase (Werte sind Mittelwert \pm SEM; gef.: gefüttert; ang.: angefüttert; n.b.: es liegen keine Daten vor).

VIII.5.2 Palmitoleinsäure (C16:1)

Der Anteil an Palmitoleinsäure im Futter lag bei 0,3%. In allen untersuchten Geweben war der Anteil von Palmitoleinsäure am Gesamtfett deutlich höher. Diese Aufkonzentrierung lässt auf eine endogene Produktion, vermittelt durch die SCD, von C16:1 schließen.

Die 8 Wochen alten, obesen ZDF-Ratten hatten dabei einen gegenüber allen anderen untersuchten Tiergruppen deutlich erhöhten Anteil an Palmitoleinsäure in den untersuchten Geweben. Bei den älteren obesen Tieren war der Anteil an Palmitoleoyl-CoA in LONG und Leber tendenziell gegenüber den schlanken Ratten erhöht, lag jedoch niedriger als bei den jungen obesen ZDF-Ratten. Die endogene Produktion von C16:1 war daher bei den insulinresistenten, prädiabetischen Tieren deutlich gegenüber allen anderen untersuchten Tiergruppen erhöht (Abb. VIII.5.2-1).

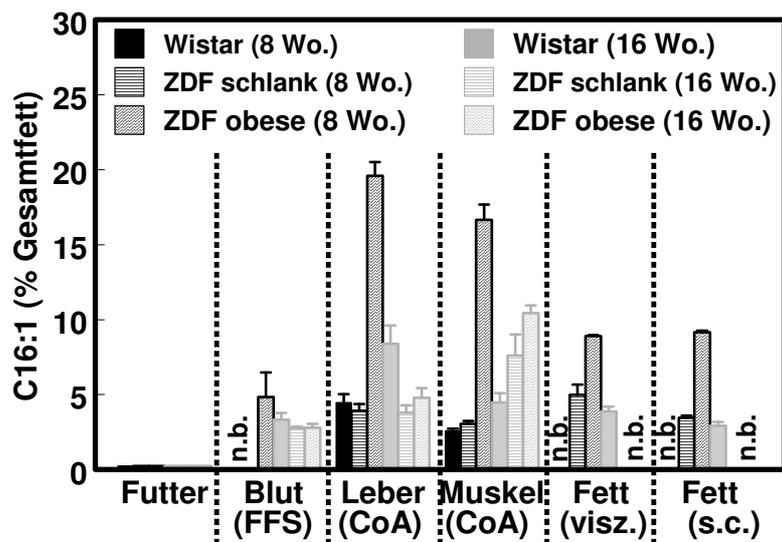


Abb. VIII.5.2-1 Anteil von Palmitoleinsäure an der Summe aller Fettsäuren in verschiedenen Geweben gefütterter Tiere sowie im Futter (Werte sind Mittelwert \pm SEM; n.b.: es liegen keine Daten vor).

Im Blut kam es während der postabsorptiven Phase bei den obesen Tieren zur Erhöhung des C16:1-Anteils. Bei den anderen untersuchten Tierstämmen blieb der Anteil im Blut konstant. In der Leber kam es in der postabsorptiven Phase bei allen untersuchten Gruppen zu einem deutlichen Absinken des C16:1-Anteils. In der Muskulatur traten keine Veränderungen auf.

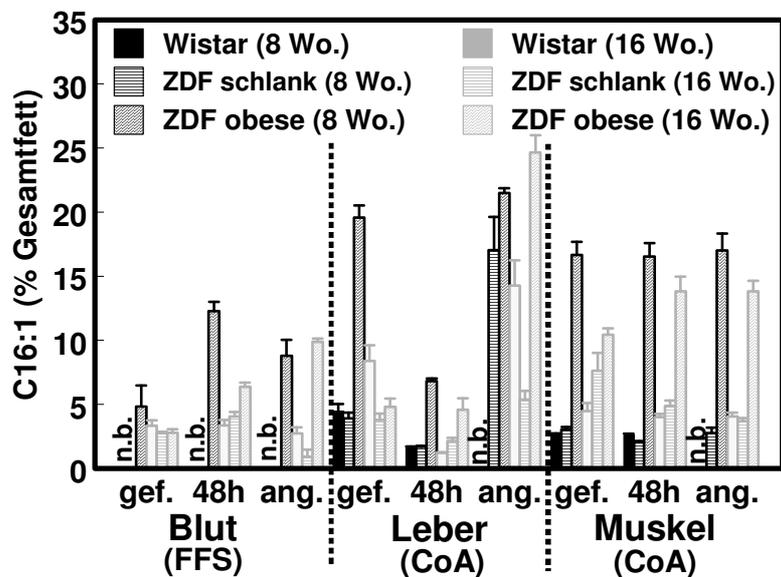


Abb. VIII.5.2-2 Anteil von Palmitoleinsäure an der Summe aller Fettsäuren in verschiedenen Geweben während der Hungerphase (Werte sind Mittelwert \pm SEM; gef.: gefüttert; ang: angefüttert; n.b.: es liegen keine Daten vor).

VIII.5.3 Stearinsäure (C18:0)

Der Anteil von Stearinsäure an den Gesamtfettsäuren lag im Futter bei 2,8%. Im Blut war der Anteil an Stearinsäure gegenüber dem im Futter deutlich erhöht (Abb. VIII.5.3-1).

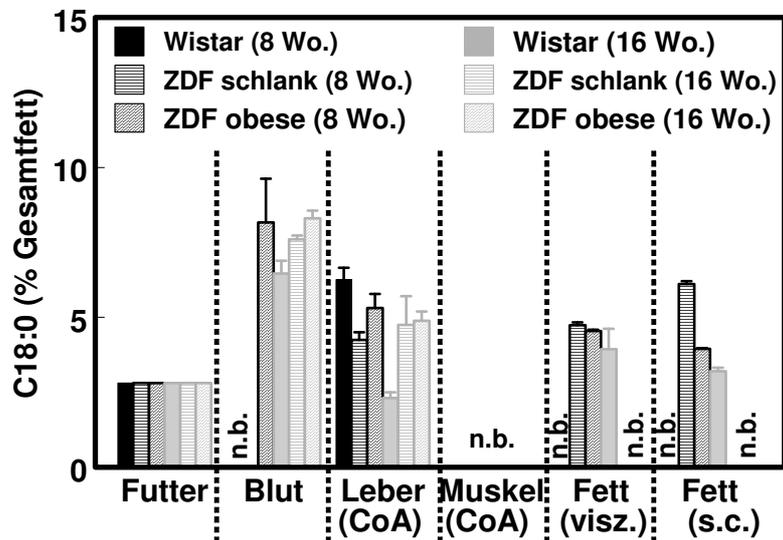


Abb. VIII.5.3-1 Anteil von Stearinsäure an der Summe aller Fettsäuren in verschiedenen Geweben gefütterter Tiere sowie im Futter (Werte sind Mittelwert \pm SEM; n.b.: es liegen keine Daten vor).

Im Blut blieb der Anteil von C18:0 während der 5-tägigen Versuchsperiode konstant. In der Leber kam es während der postabsorptiven Periode zu einem Anstieg des Stearoyl-CoA-Anteils.

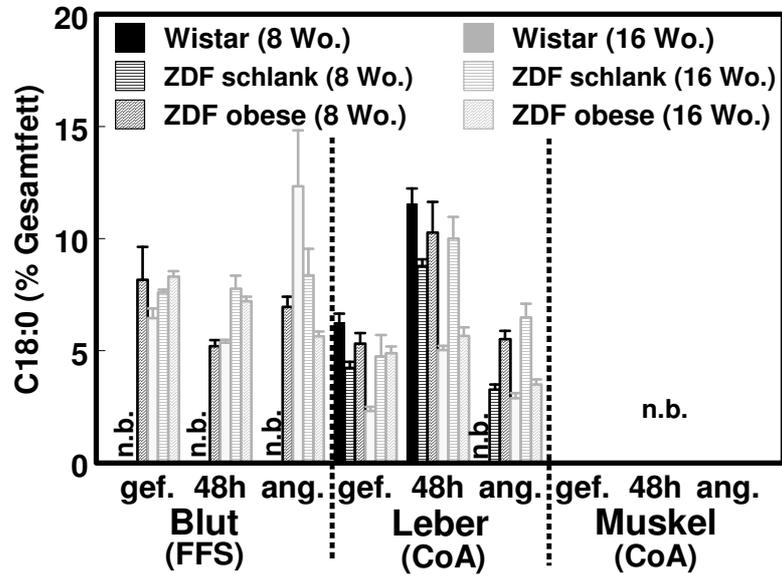


Abb. VIII.5.3-2 Anteil von Stearinsäure an der Summe aller Fettsäuren in verschiedenen Geweben während der Hungerphase (Werte sind Mittelwert \pm SEM; gef.: gefüttert; ang: angefüttert; n.b.: es liegen keine Daten vor).

VIII.5.4 Ölsäure (C18:1)

Der Anteil an Ölsäure lag im Futter bei 18,4%. Dieser Anteil war auch im Blut und in der Leber zu finden. In der Muskulatur und im Fettgewebe war der Anteil an Ölsäure dagegen gegenüber dem im Futter erhöht (Abb. VI.5.4-1).

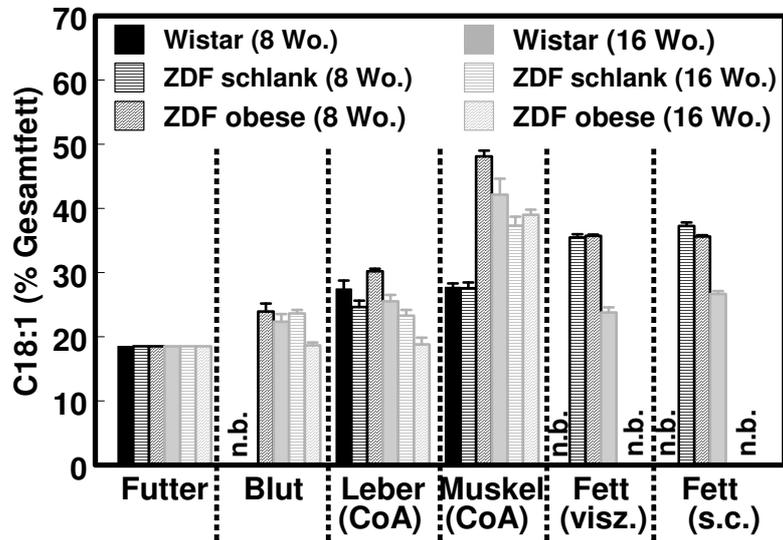


Abb. VIII.5.4-1 Anteil von Ölsäure an der Summe aller Fettsäuren in verschiedenen Geweben gefütterter Tiere sowie im Futter (Werte sind Mittelwert \pm SEM; n.b.: es liegen keine Daten vor).

Der Anteil von Ölsäure veränderte sich lediglich in der Leber tendenziell. Hier kam es, mit Ausnahme der alten obesen Tiere, zu einem Absinken des Ölsäureanteils.

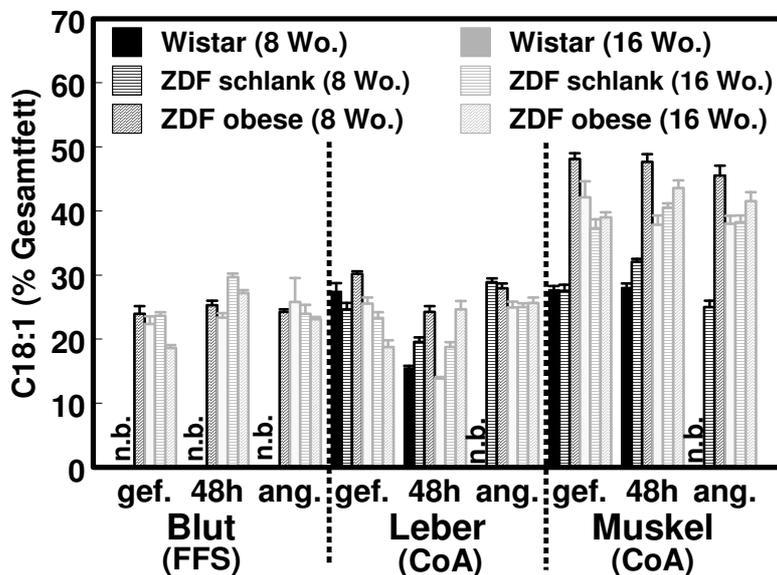


Abb. VIII.5.4-2 Anteil von Ölsäure an der Summe aller Fettsäuren in verschiedenen Geweben während der Hungerphase (Werte sind Mittelwert \pm SEM; gef.: gefüttert; ang: angefütert; n.b.: es liegen keine Daten vor).