

Aus dem
Institut für Tierhaltung und Tierzucht
der Universität Hohenheim
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie
Prof. Dr. Dr. habil. Rolf Claus

Die Regulation der Futteraufnahme beim Schwein

**Untersuchung der Wirkungen eines Serotonin Noradrenalin Wiederaufnahme-
hemmers (Sibutramin) und eines MCH-R1 Antagonisten (Compound B4)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Agrarwissenschaften

vorgelegt der
Fakultät Agrarwissenschaften
Universität Hohenheim

von

Torsten Sommer

Dipl.-Ing. sc. agr.
aus Ostfildern

Hohenheim, Mai 07

Die vorliegende Arbeit wurde am 27.09.2006 von der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“ angenommen

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2006

Prodekan: Prof. Dr. W. Bessei

Berichterstatter, 1. Prüfer: Prof. Dr. Dr. R. Claus

Mitberichterstatter, 2. Prüfer: Prof. Dr. R. Mosenthin

3. Prüfer: PD Dr. J. Zanzinger

„All animals are equal but some animals are more equal than others“

George Orwell

Für Mascha

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
2	Literatur	11
2.1	Regulation der Futteraufnahme beim Schwein	11
2.2	Gastrointestinale Regulation der Futteraufnahme	13
2.2.1	Dehnungs-, Mechano- und Chemosensoren	14
2.2.2	Ghrelin	15
2.2.3	Cholecystokinin	16
2.2.4	PYY	17
2.3	Beteiligung des Fettgewebes an der Regulation der Futteraufnahme	18
2.3.1	Leptin	18
2.3.2	Adiponektin	19
2.4	Rolle der Gonadenhormone bei der Regulation der Futteraufnahme	20
2.5	Zentralnervöse Regulation der Futteraufnahme	21
2.5.1	Der Hypothalamus	21
2.5.2	Das Stammhirn	22
2.5.3	Neuropeptide	22
2.5.3.1	NPY und AgRP	22
2.5.3.2	Melanin-concentrating hormone (MCH)	23
2.5.3.3	α -MSH	24
2.5.4	Neurotransmitter	25
2.5.4.1	Serotonin	25
2.5.4.2	Noradrenalin	28
2.6	Charakterisierung der Wirkungsweise von Sibutramin	29
3	Material und Methoden	30
3.1	Tierversuche	30
3.1.1	Versuchstierhaltung	31
3.1.2	Fütterung	32
3.1.3	Methodik der Blutentnahme und Katheterpflege	33
3.1.4	Versuchsteil „Sibutramin“	35
3.1.4.1	Versuchsdesign	35

3.1.4.2	Versuchstiere	35
3.1.4.3	Applikation von Sibutramin	35
3.1.4.4	Erfassung des Körpergewichts, Futter- und Wasseraufnahme	37
3.1.4.5	Stoffwechselkäfige	37
3.1.5	Versuchsteil „MCH-R1 Antagonist Compound B4“	37
3.1.5.1	Versuchsdesign	37
3.1.5.2	Versuchstiere	38
3.1.5.3	Applikation von Compound B4	38
3.1.5.4	Erfassung des Körpergewichts, Futter- und Wasseraufnahme	39
3.2	Analytische Methoden	40
3.2.1	Bestimmung von Wachstumshormon im Blutplasma	40
3.2.2	Bestimmung von IGF-I im Blutplasma	41
3.2.3	Bestimmung von Cortisol im Blutplasma	42
3.2.4	Bestimmung von Aldosteron im Blutplasma	43
3.2.5	Bestimmung von Harnstoff in Urin und Blutplasma	44
3.2.6	Bestimmung von Glucose im Blutplasma	45
3.2.7	Bestimmung des Körperfettgehalts	45
3.2.7.1	Messung des Körperwassers mit Hilfe von D ₂ O	46
3.2.7.2	Berechnung der Körperzusammensetzung	46
3.2.8	Bestimmung der Schilddrüsenhormone T3, T4 und TSH im Blutplasma ...	48
3.2.9	Bestimmung von Sibutramin, Desmethyl-Sibutramin und Didesmethyl-Sibutramin im Blutplasma	50
3.2.10	Bestimmung von „Compound B4“ im Blutplasma	50
3.3	Statistische Auswertung	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Versuchsteil „Sibutramin“	52
4.1.1	Konzentration von Sibutramin, Desmethyl-Sibutramin und Didesmethyl-Sibutramin im Blutplasma	52
4.1.2	Futteraufnahme	56
4.1.3	Gewichtsentwicklung	60
4.1.4	Futterverwertung	64
4.1.5	Wasserverbrauch	66
4.1.6	Körperfettgehalt	70

4.1.7	Messung von Parametern im peripheren Blutplasma	72
4.1.7.1	pGH	72
4.1.7.2	IGF-I	74
4.1.7.3	Cortisol	78
4.1.7.4	Aldosteron	80
4.1.7.5	Harnstoff.....	82
4.1.7.6	Glucose	85
4.1.7.7	Schilddrüsenhormone T3 und T4	87
4.2	Versuchsteil „MCH-R1 Antagonist Compound B4“	90
4.2.1	Konzentration des MCH-R1 Antagonisten Compound B4 im Blutplasma.	90
4.2.2	Futteraufnahme	92
4.2.3	Gewichtsentwicklung	94
4.2.4	Futterverwertung	95
4.2.5	Wasserverbrauch	96
4.2.6	Körperfettgehalt.....	98
4.2.7	Messung von Parametern im peripheren Blutplasma	99
4.2.7.1	pGH	99
4.2.7.2	IGF-I	103
4.2.7.3	Cortisol	105
4.2.7.4	Aldosteron	106
4.2.7.5	Harnstoff.....	107
4.2.7.6	Glucose	109
4.2.7.7	Schilddrüsenhormone T3 und T4	110
4.2.8	Subjektive Verhaltensbefunde.....	111
5	Diskussion.....	112
5.1	Pharmakokinetik von Sibutramin und Compound B4.....	112
5.2	Wachstum, Futter- und Wasseraufnahme.....	114
5.3	Proteinanabole GH/IGF-I Achse und Harnstoff.....	117
5.4	Cortisol- und Aldosteronkonzentration	119
5.5	Schilddrüsenhormone und Glucosekonzentrationen im Blutplasma.....	121
6	Zusammenfassung	123
6.1	Versuchsablauf	123

6.2	Ergebnisse der Sibutraminverabreichung.....	124
6.3	Ergebnisse der Verabreichung des MCH-Antagonisten.....	124
6.4	Schlussfolgerungen.....	125
7	Summary	4
7.1	Study work flow	126
7.2	Results of the sibutramine application.....	126
7.3	Results of the application of the MCH-R1 antagonist (Compound B4).....	127
7.4	Conclusions	127
8	Literaturverzeichnis	128

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AgRP	Agouti Related Peptide
ARC	arcuate nucleus (Nucleus infundibularis)
AUC	area under the curve
AUD	area under the data
BMI	body mass index (kg/m^2)
CART	Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript
CRF	Corticotropin releasing factor
GH	Growth Hormone
GHS-R	growth-hormone secretagogues receptor
GIT	Gastrointestinaltrakt
HPA	hypothalamus-pituitary-adrenal
HPT	hypothalamus-pituitary-thyroid
ICV	Intracerebroventrikulär
kj	Kilojoule
LHA	lateral hypothalamic area
LNAA	Large neutral amino acids
LSmeans	Least Square means
MCH	melanin concentrating hormone
NPY	Neuropeptide Y
NTS	Nucleus tractus solitarius
POMC	Proopiomelanocortin
PVN	Nucleus paraventricularis
PYY	Peptid YY
S.E.M.	standard error of means
TRH	thyroid-releasing hormone
TSH	thyroid-stimulating hormone
VMN	ventromedial nucleus
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Weltweit sind mehr als 1 Milliarde erwachsener Menschen übergewichtig, von Ihnen gelten 300 Millionen als fettleibig. Aufgrund der Tatsache dass Übergewicht das Risiko ernsthafter chronischer Erkrankungen wie z.B. Diabetes Typ 2, Bluthochdruck, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Schlaganfall, Arthritis und einiger Tumortypen teilweise massiv erhöht, scheint es sich zu einer der wichtigsten Krankheitsursachen der Zukunft zu entwickeln (Nammi et al., 2004; Thompson and Wolf, 2001). Daher ist die Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Regulation der Nahrungsaufnahme und damit der Energie-Homöostase derzeit eine der Hauptaufgaben der biomedizinischen Forschung.

Mit einer pharmakologischen Therapie könnte der exzessiven Nahrungsaufnahme und damit auch die beschriebenen Folgekrankheiten des Übergewichts bekämpft werden. In der Vergangenheit hatten pharmakologisch wirksame Präparate jedoch nicht akzeptable Nebenwirkungen, die bis hin zu Todesfällen reichten. Derzeit sind Sibutramin und Orlistat die einzigen zugelassenen Präparate, die in Verbindung mit einer Verhaltenstherapie, Gewichtsreduktionen von bis zu 10 % hervorrufen können. Trotz dieses beachtlichen positiven Effekts auf die Gewichtsreduktion und die Gesundheit der Patienten besteht der Bedarf nach neuen, effektiveren und besser verträglichen anti-adipösen Präparaten (Weigle, 2003). Zur Erforschung neuer Grundlagenkenntnisse von neuartigen anti-adipösen Substanzen sind aufgrund der komplexen Zusammenhänge, Untersuchungen in einem gesamten Organismus unumgänglich. Zu diesem Zweck bietet das Schwein in Bezug auf die Regulation der Nahrungsaufnahme, mit seiner physiologischen Nähe zum Menschen, geeignete Voraussetzungen (Forbes, 1995).

Das Ziel dieser Arbeit war, die Entwicklung eines Schweinmodells zur Überprüfung der Wirkungsweise von appetithemmenden Substanzen. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Erfassung der grundlegenden endokrinen Regulationsmechanismen die am Wachstum und damit auch an der Futterraufnahme beteiligt sind. Als Leithormone für aufbauende, anabole Vorgänge, wurden die mitosefördernden (Reddy, 1994) Hormone der somatotropen Achse, GH und IGF-I herangezogen. Für abbauende, katabole (Döcke, 1994) Vorgänge diente das differenzierungsfördernde (Geley, 1997) Glukocorticoid Cortisol.

Die Phänomene der Futterraufnahme und des Wachstums spielen in der tierwissenschaftlichen Forschung und in der praktischen Nutztierhaltung ebenfalls eine zentrale Rolle. Dabei geht es im Bereich der Nutztiere z.B. darum, die Futterraufnahme von Milchkühen nach dem

Einsetzen der Laktation zu maximieren oder in der Schweinehaltung, die Futteraufnahme von laktierenden Sauen zu maximieren.

2 Literatur

2.1 Regulation der Futtermittelaufnahme beim Schwein

Pflanzen können mithilfe der Photosynthese ihre Energie selbst herstellen. Tiere hingegen sind auf Futter, das sämtliche Nährstoffe beinhaltet angewiesen. Idealerweise wäre die Futtermittelaufnahme so reguliert, dass sie dem Verbrauch von bestimmten Inhaltsstoffen und Energie angepasst ist so dass sich die Energieaufnahme und der Energieverbrauch im Gleichgewicht befinden. Während der Evolution waren Regulationsprinzipien von Vorteil, welche in Zeiten des Nahrungsüberschusses die Hyperphagie förderten, um in Zeiten der Nahrungsmittelknappheit genügend Körperreserven zu haben. Beim Schwein variiert der Bedarf an den unterschiedlichen Futterinhaltsstoffen im Verlauf des Wachstums erheblich und auch im adulten Tier treten sehr variable Zustände des Energieverbrauchs z.B. durch Trächtigkeit oder Laktation auf. Trotz dieser erheblichen Variation des Energieverbrauchs und der kurzfristigen Futtermittelaufnahme, tritt längerfristig eine erstaunlich ausgeglichene Stoffwechselhomöostase ein. Die Regulation der Futtermittelaufnahme muss deshalb in die komplexe Stoffwechselregulation eingebettet und in Verbindung mit den vielfältigen Interaktionen im Gesamtstoffwechsel betrachtet werden.

Von der Futtermittelaufnahme (Ingestion) bis zur Ausscheidung (Exkretion) der nicht aufgenommenen Nahrungsinhaltsstoffe sind vielfältige Faktoren und Parameter an der Regulation der Futtermittelaufnahme beteiligt. Bei der Ingestion und der Digestion kommt es dabei zu präresorptiven Signalen, die die Futtermittelaufnahme beeinflussen. Signale, die nach der Resorption im Stoffwechselmetabolismus entstehen, wie z.B. auch die Darmhormone, werden als postresorptive Signale bezeichnet (siehe Abb. 1).

Einflussgrößen und Parameter zur Regulation der Futtermaufnahme

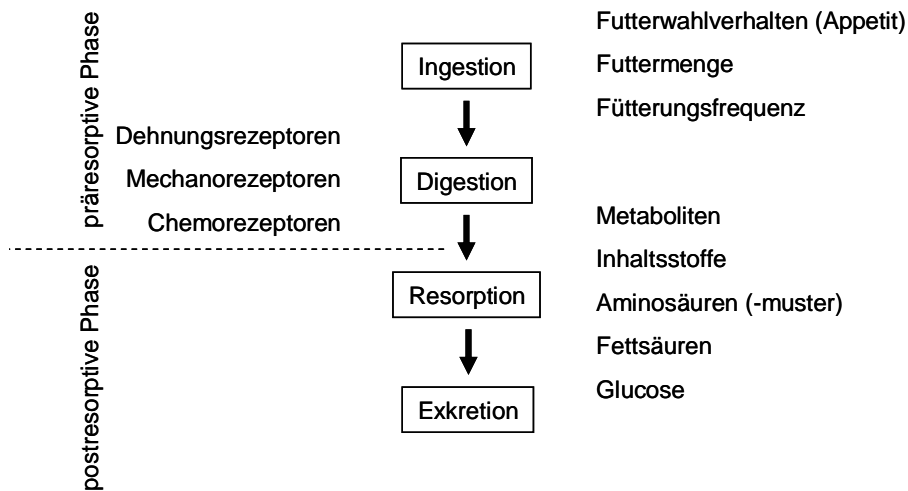


Abb. 1 Definition von Begriffen im Ablauf der Verdauung

Grundsätzlich kann die Regulation der Futtermaufnahme über eine Steuerung des Appetits und der Sättigung erfolgen. Der Appetit steuert dabei die Aufnahme bestimmter Nahrungsinhaltsstoffe und somit das Futterwahlverhalten, während die Sättigung die absolute Futtermenge determiniert (Langhans, 1999). Die Sättigung wird dabei nicht nur von einem Faktor determiniert. Vielmehr setzt Sättigung ein, wenn eine Kombination verschiedener Signale aus dem Gastrointestinaltrakt und seinen Anhangsdrüsen einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. So konnte z.B. nach einer Natrium-Propionat-Infusion in die Portalvene und einer Natrium-Acetat-Gabe in den Pansen, eine additive Reduktion der Futtermaufnahme beim Schaf festgestellt werden (Adams and Forbes, 1981).

2.2 Gastrointestinale Regulation der Futtermittelaufnahme

Der Gastrointestinaltrakt (GIT), einschließlich der Bauchspeicheldrüse, Leber und dem viszeralen Fettgewebe ist ein wichtiger Messfühler und Signalgeber der Energiehomöostase und Futtermittelaufnahme.

Dabei wirken sowohl nervös übertragene Reize, als auch die vom GIT selbst gebildeten Hormone auf die Regulation der Futtermittelaufnahme. Die nervöse Übermittlung erfolgt in der Regel über den afferenten Nervus Vagus. Dieser ist z.B. mit Rezeptoren für Ghrelin und CCK ausgestattet und aktiviert den Nucleus solitarius in der Medulla oblongata. Dort endende Neurone sind mit den an der Futtermittelaufnahme beteiligten Regionen im Hypothalamus verbunden. Für einige Gastrointestinale Hormone ist allerdings auch bekannt, dass sie die Blut-Hirn-Schranke passieren und einen direkten zentralnervösen Effekt besitzen. Tab. 1 zeigt eine Übersicht der derzeit diskutierten Hormone und deren Bildungsort. Aufgrund der Vielzahl, der bisher bekannten Gastrointestinalen Hormone wurde jeweils auf ein Hormon aus dem Magen, dem Duodenum und den tiefer liegenden Darmabschnitten näher eingegangen.

Tab. 1 Übersicht der aus dem GIT stammenden, an der Futtermittelaufnahme und der Energiehomöostase beteiligten Hormone

Substanz	Bildungsort	Futtermittelaufnahme
Ghrelin	Magen	steigernd
CCK	Duodenum	hemmend
PYY	Jejunum, Ileum, Colon	hemmend
Bombesin	Magen	hemmend
GLP-1	Duodenum	hemmend
Oxyntomodulin	Duodenum	hemmend
GIP	Duodenum	hemmend
Somatostatin	GIT	hemmend
gastrin-releasing peptide	GIT	hemmend
Neuromedin B	GIT	hemmend
Glucagon	Pankreas	hemmend
Insulin	Pankreas	langfristig hemmend

2.2.1 Dehnungs-, Mechano- und Chemosensoren

Der Geschmack des Futtermittels ist für die freiwillige Futteraufnahme beim Schwein von großer Bedeutung. Dabei kommt es zunächst auf der Zunge und im Maul zur Wahrnehmung des Geschmacks. Dieser entsteht durch die Wahrnehmung der „klassischen“ vier Geschmacksrichtungen süß, sauer und bitter, salzig die von den in den Geschmacksknospen sitzenden Geschmacksrezeptoren vermittelt wird (Hennig and Ranft, 1995).

Es wird davon ausgegangen, dass spezifische Rezeptoren für essentielle Nährstoffe, wie z.B. Aminosäuren oder Fettsäuren bereits in der Maulhöhle vorhanden sind. So können sich wachsende Schweine, bei freiem Zugang zu einer protein- und einer energiereichen Ration, eine an ihr Wachstumsvermögen angepasste Ration zusammenstellen (Bradford and Gous, 1991; Kyriazakis et al., 1990). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Schweine und Ferkel, Rationen mit einem ausgeglichenen Verhältnis von Tryptophan zu den langen neutralen Aminosäuren (large neutral amino acids; LNAA) bevorzugen (Ettle and Roth, 2004; Henry et al., 1992). Zur Identifikation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Maulhöhle, ist bei Ratten ein kaliumkanalabhängiger Mechanismus bekannt (Gilbertson et al., 1998).

Nachdem das Futter in der Maulhöhle geschmacklich und strukturell erfasst wurde, wird es abgeschluckt und gelangt über den Ösophagus in den Magen, der sich bei Hunger kontrahiert. Da der Magen das Speicherorgan des aufgenommenen Futters ist, dehnt er sich im Laufe der Futteraufnahme aus. Seit den Versuchen von Janowitz und Grossman ist die Magendehnung als primäres und wichtiges Sättigungssignal allgemein anerkannt (Janowitz and Grossman, 1949). Die Dehnung wird durch Sensoren in der Magenwand erfasst und dem ZNS über den afferenten Nervus Vagus mitgeteilt. Dort wird als erster Schritt der Nucleus solitarius in der Medulla oblongata aktiviert (Schwartz, 2000). Der GIT ist in der Lage sehr energiedichten Rationen zu erkennen und die Futtermenge der Energiedichte anzupassen, bevor die Sättigung durch Dehnungsrezeptoren in der Magenwand ausgelöst wird (Owen and Ridgman, 1968).

Weiterhin sind an der Regulation der Magenentleerung und des Sättigungsgefühls Dehnungs- und Osmorezeptoren in Duodenum und Jejunum beteiligt (Gregory et al., 1989). So kommt es zu einer von der Molarität abhängigen Reduktion der Futteraufnahme bei duodenaler Infusion, unabhängig ob Glucoselösung oder Kochsalzlösung infundiert wurde (Haupt et al., 1979). Beim Schwein soll die Dehnung des Jejunums bei der Beendigung der Futteraufnahme eine größere Rolle spielen, als die des Duodenums (Haupt, 1985). Eine Abhängigkeit der Futteraufnahme von der Lebendmasse ist beim Schwein ebenfalls bekannt (Gregory et al., 1990).

Generell sind Schweine sehr geruchsempfindlich. In Bezug auf die freiwillige Futterraufnahme hatte die Ektomie des Bulbus olfactorius allerdings keinen Einfluss auf das längerfristige Futterraufnahmeverhalten bei wachsenden Schweinen (Baldwin and Cooper, 1979)

2.2.2 Ghrelin

1999 wurde ein bis dahin unbekannter endogener Ligand, der an den growth-hormone secretagogues receptor (GHS-R) bindet aus Rattenmagen aufgereinigt und identifiziert. Es handelte sich um ein Peptid das aus 28 Aminosäuren besteht und Ghrelin genannt wurde (ghre ist die Protoindogermanische Wurzel des Wortes 'grow') (Kojima et al., 1999). Es wird überwiegend in den Fundusdrüsen des Magens produziert. Sein Vorkommen ist aber auch im Dünndarm, Pankreas, in der Lunge, in der Hypophyse, in den Gonaden und in der Schilddrüse bei Ratten und Menschen beschrieben (van der Lely et al., 2004). Immunocytochemisch wurde Ghrelin auch im Hypothalamus nachgewiesen, allerdings konnte noch kein Nachweis auf mRNA Ebene stattfinden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das im Hypothalamus vorkommende Ghrelin, peripheren Ursprungs ist (Rindi et al., 2004). Ghrelin ist das bisher einzig bekannte „Hungererzeugende“ Hormon, das vom Magen in die Blutbahn abgegeben wird. Man geht davon aus, dass Ghrelin bei der Freisetzung von Wachstumshormon (Takaya et al., 2000) und bei der Regulation der Futterraufnahme (Lawrence et al., 2002) beteiligt ist. Dabei scheinen die dafür zugrunde liegenden Regulationsmechanismen unterschiedlich zu sein (Bjursell et al., 2005). Ghrelin aktiviert Neurone mit den Transmittern Neuropeptide Y (NPY) und Agouti Related Peptide (AgRP) die vom hypothalamischen Nucleus arcuatus vor allem zum Nucleus paraventricularis verlaufen. Von beiden Neuropeptiden, wie auch von Ghrelin, ist eine Steigerung der Futterraufnahme bei intracerebroventrikulärer Injektion, bei der Ratte bekannt (Seoane et al., 2003).

Bei abgesetzten Ferkeln kommt es während eines 72-stündigen Futterentzugs zunächst in den ersten 12 Stunden zu einer Reduktion von Ghrelin. Nach 12 Stunden ohne Futter kommt es dann zu einem Anstieg der Ghrelinkonzentration im Blutplasma bis nach 48 Stunden eine Plateauphase erreicht wird. Zwischen 48 und 72 Stunden fällt die Ghrelinkonzentration im Plasma dann allerdings wieder auf ihr ursprüngliches Niveau zurück. Im Zusammenhang mit dem wiederkehrenden Abfall von Ghrelin, wird dessen Wirkung auf die Produktion von Magensäure und der Magenperistaltik diskutiert, die bei einem völligen Futterentzug nicht zwingend benötigt wird (Salfen et al., 2003). Bei exogener Verabreichung von Ghrelin an Absetzferkel kommt es bei unveränderter Futterraufnahme zu einem gesteigerten Wachstum.

Dies kann durch einen erhöhten Muskelansatz, aufgrund der erhöhten GH-Konzentrationen nach exogener Ghrelinverabreichung erklärt werden (Salfen et al., 2004).

2.2.3 Cholecystokinin

Cholecystokinin (CCK), das 1973 ursprünglich aus den Därmen von Schweinen isoliert wurde, ist das am besten und am längsten untersuchte „Sättigungs-“ Hormon beim Schwein. Hauptsächlich wird CCK bei anfluten des Futterbreis von enteroendokrinen Mucosazellen des Duodenums und des Jejunums in das Darmlumen sezerniert (DOCKRAY, 1976). Daneben ist CCK auch ein Neuropeptid und wird als solches im Gehirn gebildet (Buffa et al., 1976). Im Schweinehirn findet man das CCK-octapeptid (CCK8), während es im Schweinedarm zusätzlich auch als CCK33, CCK39, CCK58 und CCK8 anzutreffen ist. Generell verringert CCK die Futteraufnahme, fördert die Gallenblasenkontraktion, die Pankreassekretion, die Magenentleerung und die Darmmotorik (Badman and Flier, 2005).

Beim Schwein verringert sich die Futteraufnahme sowohl nach intravenöser als auch nach intraduodener Infusion von CCK. Im Gegensatz dazu konnte allerdings keine Verringerung der Futteraufnahme nach der Infusion von CCK in die Vena portae festgestellt werden (Haupt, 1983). Nach der intravenösen Verabreichung eines spezifischen CCK A Rezeptor Antagonisten, konnte kein hemmender Effekt von CCK auf die Futteraufnahme mehr festgestellt werden (Ebenezer et al., 1990). Weder die intracerebroventrikuläre Injektion eines CCK A noch eines CCK B Rezeptor Antagonisten hatte einen Effekt auf die Futteraufnahme. Allerdings verringerte die intracerebroventrikuläre Injektion von CCK die Futteraufnahme. Daraus kann geschlossen werden, dass der periphere CCK A Rezeptor für die hemmende Wirkung von CCK im Bereich des Abdomens verantwortlich ist, während der Rezeptor für die zentralnervöse Wirkung von CCK beim Schwein bislang noch nicht bekannt ist (Parrott, 1993). Eine Beteiligung des serotonergen Systems bei der zentralnervösen Übermittlung von CCK, namentlich die Beteiligung eines 5-HT_{1C} Rezeptors (siehe 2.5.4.1), wird bei der Ratte kontrovers diskutiert (Poeschla et al., 1993). Allerdings konnte keine Veränderung der Reduktion der Futteraufnahme durch CCK beim Einsatz von 5-HT Rezeptor Antagonisten beim Schwein nachgewiesen werden (Ebenezer et al., 1999b). Die Immunisierung von Ebern und Kastraten, gegen CCK8 führt zu einer erhöhten Futteraufnahme bei gleichzeitig gesteigertem Wachstum und gleich bleibender Körperzusammensetzung (Pekas and Trout, 1993). Einen Einfluss auf die Magenpassagezeit der Nahrung, wie Sie bei anderen Spezies beschrieben ist, konnte beim Schwein nicht festgestellt werden (Gregory et al., 1995).

2.2.4 PYY

1980 isolierte Tatemoto aus distalem Schweinedünndarm ein aus 36 Aminosäuren aufgebautes Polypeptid, das an jedem Ende einen Tyrosinrest hatte; das Peptid YY (PYY) (Tatemoto and Mutt, 1980). Erste Untersuchungen ergaben, dass PYY die exogene Pankreassekretion inhibiert, vasokonstriktorische Eigenschaften besitzt sowie einen hemmenden Effekt auf die Darmmotilität hat (Tatemoto, 1982a). Eine proteolytisch um zwei Aminosäuren verkürzte Form, das PYY₃₋₃₆, kann die Blut-Hirn-Schranke passieren und ist im ZNS der Ligand für den Y2 Rezeptor. Dabei handelt es sich um eine Rezeptorfamilie, die die Aktivierung von NPY Neuronen inhibiert, POMC freisetzt und die Futteraufnahme senkt (Badman and Flier, 2005). NPY ist eines der potentesten kurzfristigen Stimuli der Futteraufnahme (siehe 2.2.4). Kontrovers diskutiert wird der Einfluss von exogen verabreichtem PYY₃₋₃₆ auf die Futteraufnahme bei der Ratte (Batterham et al., 2004; Batterham et al., 2002; Tschop et al., 2004). Bei wachsenden Schweinen steigt, postprandial die endogene PYY Konzentration im Blutplasma an, und könnte somit zur Beendigung der Futteraufnahme beitragen. Die weitaus höchsten PYY Konzentrationen sind beim Schwein allerdings im Colon und Rektum gemessen worden (Adrian et al., 1987).

2.3 Beteiligung des Fettgewebes an der Regulation der Futtermittelaufnahme

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass das weiße Fettgewebe nicht nur ein Energiespeicher, sondern auch ein endokrin hoch aktives Gewebe ist. In diesem Zusammenhang scheint dem viszeralem Fettgewebe eine größere Bedeutung als dem subkutanen Fettgewebe zuzukommen. Über die vom Fettgewebe sezernierten Faktoren kommuniziert es mit vielen anderen Organen und Geweben, wie z.B. der Leber, der Muskulatur, dem Pankreas oder dem Gehirn. Dafür werden Fettgewebefaktoren in die Blutbahn abgegeben oder möglicherweise über transsynaptische Verbindungen zwischen dem Fettgewebe und z.B. dem Hypothalamus transportiert (Czaja et al., 2003). Zwar sind die physiologischen Detailmechanismen noch unbekannt, es kann aber davon ausgegangen werden, dass das Fettgewebe eine wichtige Rolle für die Regulation der Futtermittelaufnahme, des Stoffwechsels und letztendlich auch der Fruchtbarkeit spielt. Eine Übersicht mit den im Fettgewebe produzierten, an der Futtermittelaufnahme beteiligten Proteohormonen bzw. Zytokinen und deren physiologische Funktion, ist in Tab. 2 wiedergegeben (Staiger and Häring, 2005).

Tab. 2 Übersicht über einige Hormone und Zytokine aus dem Fettgewebe die an der Regulation der Futtermittelaufnahme beteiligt sind (verändert nach Staiger et al.; 2005)

Peptid	physiologische Funktion
Leptin	langfristige Regulation des Körpergewichts, Insulin Sensitivität, Insulin Sekretion, Reproduktion, Sättigung
Adiponectin	Reduktion der Glukoneogenese, Insulin Sensitivität, Fettverteilung
Resistin	Reduktion der Insulin Sensitivität, Inhibierung der Adipogenese
Macrophage migration inhibitory factor	Immunregulation, Insulin Sekretion
Visfatin	Reduktion der Insulin Sensitivität

2.3.1 Leptin

Leptin ist ein Peptidhormon, das aus 167 Aminosäuren aufgebaut ist. Es wird überwiegend im Fettgewebe in Abhängigkeit vom Körperfettgehalt produziert. Seine Entdeckung erfolgte durch die Untersuchung der genetisch determinierten Obesitas (*ob/ob*) Maus (Zhang et al., 1994). Leptin schloss die Lücke, die lange Zeit bei der Suche nach der stofflichen Substanz der Mitte des 19. Jahrhunderts postulierten, lipostatischen Theorie geherrscht hatte. Generell

führt die i.c.v. oder systemische Verabreichung von Leptin zu einer Reduktion der Futteraufnahme und des Körpergewichts. Leptin besitzt einen rezeptor-vermittelten Transportmechanismus der Blut-Hirn-Schranke. Es interagiert im Hypothalamus sowohl mit appetitsteigernden (NPY, MCH; Orexin) als auch mit appetithemmenden Neuronen (POMC) (Staiger and Häring, 2005). Des Weiteren wird eine Beeinflussung der Sensitivität der GIT Hormone im NTS durch Leptin diskutiert (Morton et al., 2005). Einschränkend muss erwähnt werden, dass gerade bei fettleibigen Tieren eine erhöhte physiologische Leptinkonzentration im Blutplasma vorliegt. Diese führt bei diesen Tieren nicht zu einer Reduktion der Futteraufnahme, was mit einer zentralnervösen Leptinresistenz erklärt wird (Houseknecht et al., 1998).

Bei präpubertären Sauen führt die i.c.v. Injektion von Leptin zu einer Reduktion der Futteraufnahme und einer erhöhten GH-Sekretion (Barb et al., 1998).

2.3.2 Adiponektin

Eines der vielversprechendsten Zytokine aus dem Fettgewebe mit Bedeutung für die Regulation der Futteraufnahme und der Energiehomöostase, ist das 1995 entdeckte Adiponektin (Scherer et al., 1995). Adiponektin ist ein Adipozyten spezifisches Protein, das im Blut in einer, für Hormone, ungewöhnlich hohen Konzentration zirkuliert (ca. 0,01% des Blutplasmaproteins). Im Gegensatz zu anderen Adipozytokinen ist seine Konzentration umgekehrt proportional zum Körperfettgehalt. Darüber hinaus ist ein ausgeprägter Geschlechtsdimorphismus bekannt. So weisen Frauen eine ca. 50% höhere Adiponektinkonzentration im Plasma auf als Männer (Staiger and Häring, 2005). In Übereinstimmung mit den Befunden bei Ratten und Mäusen ist auch beim Schwein eine niedrige Adiponektinkonzentration bei mageren im Vergleich zu fetten Tieren nachzuweisen. In isolierten Fettzellen des Schweins konnte *in vitro* eine fördernde Wirkung von Adiponektin auf die Lipogenese festgestellt werden (Jacobi et al., 2004). Die für Adiponektin zuständigen schweinespezifischen Rezeptoren, AdipoR1 und AdipoR2 sind in verschiedenen Geweben nachgewiesen. Die Rezeptorexpression scheint dabei von diversen Mediatoren der Entzündungskaskade sowie direkt von der Futteraufnahme beeinflusst zu werden (Ding et al., 2004; Lord et al., 2005).

2.4 Rolle der Gonadenhormone bei der Regulation der Futteraufnahme

Beim Schwein ist schon seit längerem bekannt, da sich die freiwillige Futteraufnahme von Börgen, Sauen und Kastraten unterscheidet (Metz et al., 2002). Die exogene Steroidapplikation, sowohl von Testosteron als auch von Estrogenen, an Börgen, führt zur Hemmung der Futteraufnahme (Claus and Weiler, 1987). Neuere Untersuchungen zeigen dass Estrogene im hypothalamischen PVN, direkt die Konzentration von Neuropeptid Y senken (Bonavera et al., 1994). Eine dabei postulierte Beteiligung von Leptin oder MCH an der durch Estrogenen verursachten Hypophagie wurde zumindest im Mausmodell widerlegt (Tritos et al., 2004). Bei der Vermittlung der estrogeninduzierten Reduktion der Futteraufnahme sprechen erste Ergebnisse für eine Beteiligung des α -ER während der β -ER eher eine untergeordnete Rolle spielt (Roesch, 2005). Bei der hypothalamischen Vermittlung der testosteroninduzierten Reduktion der Futteraufnahme ist, wie bei den Estrogenen, NPY an zentraler Stelle beteiligt (Münzer et al., 2001).

2.5 Zentralnervöse Regulation der Futteraufnahme

Die vom GIT einschließlich seiner Anhangsdrüsen und vom Fettgewebe produzierten peripheren Signale sind über zwei verschiedene Wege an der zentralnervösen Regulation der Futteraufnahme beteiligt. Entweder sie aktivieren peripher den Nervus Vagus, der wiederum den Nucleus solitarius (NTS) im Stammhirn aktiviert, oder sie passieren die Blut-Hirn-Schranke und haben damit die Möglichkeit direkt in Kommunikation, mit den im Hypothalamus lokalisierten Bereichen zu treten (Schwartz et al., 2000).

2.5.1 Der Hypothalamus

Erste Berichte über eine Beteiligung des Hypothalamus bei der Entstehung von Übergewicht, reichen bis in das Jahr 1840 zurück (Bray and York, 1979). Aber erst durch wissenschaftliche Studien, bei denen Mikroläsionen im Hypothalamus erzeugt wurden, ist ein Hunger- und ein Sättigungszentrum im Hypothalamus allgemein anerkannt (Brobeck et al., 1943). Durch die Zusammenfassung der Ergebnisse dieser ersten Läsions- und Stimulationsstudien durch das Grundlagenwerk von Stellar 1954, wurde der ventromediale Nucleus (VMN) als Sättigungszentrum und der laterale hypothalamische Bereich (LHA; lateral hypothalamic area) als Hungerzentrum identifiziert (Stellar, 1954). Der Hypothalamus wird heute in Kernbereiche unterteilt, die eine Ansammlung von Neuronen mit unterschiedlichen Funktionen darstellen. Neuronale Verbindungen zwischen diesen Nuclei und zu und von anderen Bereichen im Gehirn, ermöglichen es dem Hypothalamus, die peripheren Signale aus dem Stammhirn mit dem vegetativen Nervensystem und dem GIT zu verschalten und somit die Futteraufnahme und den Energieverbrauch zu regulieren. Der im Bereich des Hypophysenstiels und damit am Boden des Hypothalamus liegende Nucleus arcuatus (ARC, Nucleus infundibularis) besitzt dabei die Rezeptoren für die an der Futteraufnahme beteiligten Hormone und Neuropeptide (Neary et al., 2004). Durch die an dieser Stelle teilweise durchlässige Blut-Hirn-Schranke, können die im peripheren Blut vorkommenden Botenstoffe direkt mit diesen Rezeptoren reagieren. Es ist daher der Bereich, in dem die primäre Reaktion stattfindet, in deren Folge eine ganze hypothalamische Signalkaskade abläuft. Man spricht daher auch von Neuronen erster Ordnung im Nucleus arcuatus. Eine besondere Bedeutung wird in diesem Zusammenhang zwei verschiedenen Arten von Neuronen beigemessen: den Futteraufnahme senkenden, POMC exprimierenden Neuronen und den Futteraufnahme stimulierenden, NPY und AgRP exprimierenden Neuronen (Murphy and Bloom, 2004).

Auch beim Schwein führt die Zerstörung des Sättigungszentrums im ventromedialen Hypothalamus (VMN) zu Hyperphagie (Khalaf, 1969) und dementsprechend die Zerstörung

des Hungerzentrums im lateralen Hypothalamus (LHA) zu Hypophagie (Khalaf and Robinson, 1972).

2.5.2 Das Stammhirn

Nach der Futteraufnahme läuft eines der Sättigungssignale über die afferenten Nervus Vagus Fasern zum Stammhirn (Williams et al., 2001). Zwischen dem NTS im Stammhirn und dem PVN und dem LHA im Hypothalamus bestehen enge neuronale Verbindungen. Serotonerge Neuronen sind auch zwischen den Raphkernen im Stammhirn und dem ARC bekannt (Neary et al., 2004).

2.5.3 Neuropeptide

2.5.3.1 NPY und AgRP

Das Neuropeptid Y (NPY) gehört zur Familie der pankreatischen Peptide, zu denen auch das PYY gehört. Es ist im ZNS, und dort insbesondere im Hypothalamus weit verbreitet. Erstmals aus dem Gehirn von Schweinen isoliert ist NPY ebenso wie PYY der natürliche Ligand der Y-Rezeptor Familie (Tatemoto, 1982b). Es ist das wohl am besten untersuchte appetitstimulierende Neuropeptid, das hauptsächlich in den Neuronen des ARC produziert wird. Diese Neuronen haben Ausläufer in fast alle anderen Bereiche des Hypothalamus und des Stammhirns. NPY steigt bei Futterentzug in der Ratte an (Kalra et al., 1999). Darüber hinaus besitzt NPY in der Ratte bei intracerebroventrikulärer oder hypothalamischer Verabreichung einen starken appetitsteigernden Effekt (Stanley et al., 1986; Tritos et al., 1998). Eine Veränderung der zentralnervösen NPY Produktion kann durch eine Vielzahl von peripheren GIT und Fettgewebssignalen provoziert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass NPY eine zentrale Funktion in der Vermittlung von Futteraufnahme, Lipogenese, Wachstum und Fruchtbarkeitssteuerung besitzt (Kalra et al., 1999). So senkt die intracerebroventrikuläre (ICV) Verabreichung von NPY beim Schwein die LH-Konzentration im peripheren Blutserum (Barb, 1999). Ein stimulierender Effekt auf die Futteraufnahme von ad libitum gefütterten Schweinen nach i.c.v. Injektion von NPY ist nachgewiesen (Parrott et al., 1986).

Das Agouti related Peptide wird in denselben Neuronen wie NPY produziert und meistens zu diesem coexprimiert. Es blockt den Melanocortin 3 und 4 Rezeptor und hemmt damit die verzehrsdepressive Wirkung von α -MSH (siehe 2.5.3.3), bzw. stimuliert damit die Futteraufnahme bei Ratten (Rossi et al., 1998). Ein Effekt auf die Futteraufnahme beim Schwein konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Der Grund dafür könnte in einer beim

Hausschwein verbreiteten heterozygoten MC4 Rezeptor Mutation liegen (Barb et al., 2004). Interessanterweise ist die AgRP und MC4-R mRNA Expression in schweren Ferkeln höher als in leichten, was ein Hinweis auf eine Bedeutung dieses Systems in der Entwicklung von Schweinen sein könnte (Dyer et al., 2000).

2.5.3.2 Melanin-concentrating hormone (MCH)

Lange Zeit wunderten sich Ichthyologen und Naturwissenschaftler über die Fähigkeit von bestimmten Knochenfischen, ihre Hautpigmentierung in Reaktion auf den sie jeweils umgebenden Hintergrund in Hell oder Dunkel anzupassen. Das Interesse an dieser Strategie der Feindabwehr führte 1983 zur Isolation des Melanin konzentrierenden Hormons (melanin-concentrating hormone, MCH) aus den Hypophysen des Hundslachses (*Oncorhynchus keta*) (Kawauchi et al., 1983). Nachdem schon länger bekannt war, dass das α -melanin stimulierende Hormon (α -MSH) für die Dunkelfärbung des Teguments von Knochenfischen zuständig ist, wurde mit der Entdeckung des MCH ein antagonistischer Gegenspieler mit der Aufgabe zur Hellfärbung gefunden. MCH ist ein aus 19 AS bestehendes Peptid, das aus proteolytischer Spaltung aus einer Pre-Pro Form entsteht. Außer MCH entstehen dabei noch zwei andere Peptide, das Neuropeptid GE (NGE) und das Neuropeptid EI (NEI) (siehe Abb. 2).

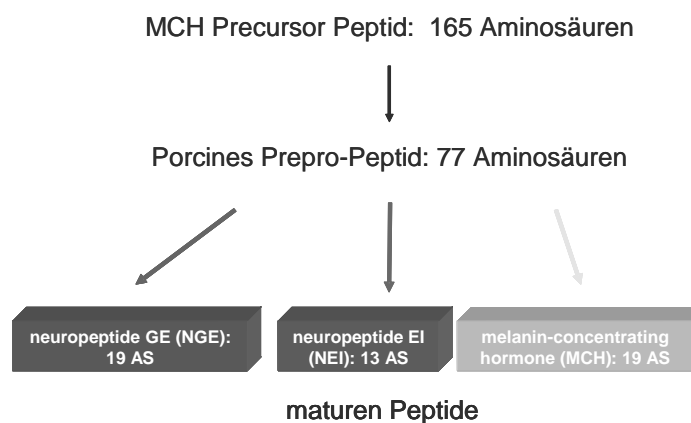


Abb. 2 Entstehung des matten MCH Peptids aus dem MCH Precursor

Als Rezeptor des MCH wurde MCH-R1 identifiziert (Bachner et al., 1999; Chambers et al., 1999; Saito et al., 1999). Mittlerweile ist noch ein zweiter MCH Rezeptor (MCH-R2) hinzugekommen (Hill et al., 2001).

Bezüglich der Wirkung auf die Futtermittelaufnahme gab es zunächst widersprüchliche Ergebnisse. So konnte nach i.c.v. Injektion von MCH an Ratten eine reduzierte Futtermittelaufnahme festgestellt werden (Presse et al., 1996). Jedoch wurde im selben Jahr auch eine Futtermittelaufnahme steigernde Wirkung von MCH an Ratten festgestellt (Qu et al., 1996) und durch weitere Untersuchungen an der Ratte bestätigt (Edwards et al., 1999; Ludwig et al., 1998; Rossi et al., 1997). Die Wirkung von MCH auf die Futtermittelaufnahme tritt bei diesen Untersuchungen in Abhängigkeit vom Dosierungszeitpunkt auf.

Interessanterweise ist MCH auch an der Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (hypothalamus-pituitary-adrenal axis; HPA) beteiligt. Zunächst wurde aber, wie bei der Futtermittelaufnahme, eine vom Zeitpunkt im circadianen Rhythmus abhängige Wirkung von MCH auf die HPA Achse bei der Ratte festgestellt. So kommt es bei der Ratte während niedrigen ACTH Werten im circadianen Verlauf zu einer Stimulation von CRH und ACTH (Jezova et al., 1992), während es bei hohen ACTH Werten zu einer Reduktion von CRH und ACTH kommt (Bluet-Pajot et al., 1995). Neuere Untersuchungen deuten auf eine stimulierende Wirkung von MCH auf Corticosteron hin (Ashmeade et al., 2000). Kennedy et al. zeigte, dass nach einer i.c.v. Injektion von MCH eine Stimulation der HPA-Achse stattfindet, die durch die Verabreichung eines MCH-R1 Antagonisten inhibiert wird (Kennedy et al., 2003). Bei adrenaletomierten Ratten führt eine i.c.v. Injektion von MCH zu keiner Stimulation der Futtermittelaufnahme, wohingegen es zu einer Stimulation bei adrenaletomierten und mit Glukocorticoid supplementierten Ratten kommt (Drazen et al., 2004).

Beim Schwein wurde die MCH mRNA in Regionen des Hypothalamus nachgewiesen, die bei der Regulation der Futtermittelaufnahme beteiligt sind. Dabei ist diese positiv mit den Blutplasmakonzentrationen von Insulin und den hypothalamischen mRNA Gehalten von NPY, Orexin und AGRP korreliert. Schwerere Ferkel wiesen einen Trend zu höheren hypothalamischen MCH mRNA Gehalten auf (Matteri et al., 2000). Der MCH-R1 wurde beim Schwein im Hypothalamus, in der Hypophyse, in der Leber, in der Nebenniere und im Colon auf mRNA Ebene nachgewiesen (Prestle et al., 2004).

2.5.3.3 α -MSH

Das aus dem Pro-opio-melanocortin (POMC) proteolytisch abgespaltene α -MSH, gehört zur Gruppe der Melanocortine und ist der wichtigste endogene Ligand des Melanocortin 3 und des Melanocortin 4 Rezeptors (Ollmann, 1997). MC4-R knock out Mäuse sind genetisch fresssüchtig und fettleibig (Huszar et al., 1997). Beim Schwein verursacht die i.c.v Injektion von α -MSH eine Verminderung der Futtermittelaufnahme (Barb et al., 2004). Agouti related Peptide (AgRP) steigert die Futtermittelaufnahme durch die Blockierung des ebenfalls für die

verzehrdepressive Wirkung des α -MSH zuständigen MC4-Rezeptors (Marsh et al., 1999). Beim Menschen ist eine MC4-R Mutation bei ca. 3-4 % einer Versuchsgruppe aus Personen mit einem BMI über 30 bekannt (Farooqi et al., 2000).

Die Rolle einer MC4-R Mutation als QTL-Kandidatengen für die Rückenspeckdicke, Wachstum und Futteraufnahme wird beim Schwein kontrovers diskutiert. Kim et al. beschreibt eine Korrelation zwischen dem MC4-R Genotyp und der Rückenspeckdicke, der täglichen Zunahme und der täglichen Futteraufnahme (Kim et al., 2000), während Park et al. kein Zusammenhang zwischen diesen Merkmalen und der MC4-R Variante fand (Park et al., 2002). In der F2 Generation einer Mangalitza x Pietrain Kreuzung konnte eine erhöhte Futteraufnahme bei Trägern der Rezeptormutation nachgewiesen werden, wenngleich diese erhöhte Futteraufnahme zwar zu gesteigerten täglichen Zunahmen nicht aber zu einem erhöhten Körperfettgehalt führten (Meidtner et al., 2005)

2.5.4 Neurotransmitter

2.5.4.1 Serotonin

Bereits Ende der 40er Jahre wurde eine Substanz identifiziert, die bei der Bildung von Blutserum aus Thrombocyten freigesetzt wird, den Gefäßtonus erhöht und daher als „Serotonin“ bezeichnet wurde (Rapport et al., 1948). Die spätere chemische Identifikation ergab, dass es sich dabei um das hydroxylierte biogene Amin der Aminosäure Tryptophan (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) handelt (Erspamer and Asero, 1952). Zu 90% kommt 5-HT im GIT vor und zu 10 % im ZNS. Ausgangssubstanz der Serotoninbiosynthese ist die Aminosäure L-Tryptophan, die von 5-HT produzierenden Zellen aus dem Blut aufgenommen wird. Ins ZNS gelangt Tryptophan über ein Transportsystem, das es mit langen neutralen Aminosäuren (LNAA; Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin) teilt und mit denen es sich kompetitiv hemmt (Fernstrom, 1977). Limitierender Schritt der Serotoninsynthese ist die Umwandlung von Tryptophan zu „5-Hydroxytryptophan“ (5-HTP) durch das Enzym „Tryptophan-Hydroxylase“. Interessanterweise wird die Expression dieses Enzyms durch Glucocorticoide entscheidend reguliert (Sze et al., 1976). Durch eine anschließende Decarboxylierung entsteht 5-HT. Der Abbau erfolgt durch die mitochondriale Monoaminoxidase. Dabei entsteht im ersten Schritt 5-Hydroxyindolacetaldehyd, dessen Dehydrierung zu 5-Hydroxyindolacetat führt (siehe Abb. 3).

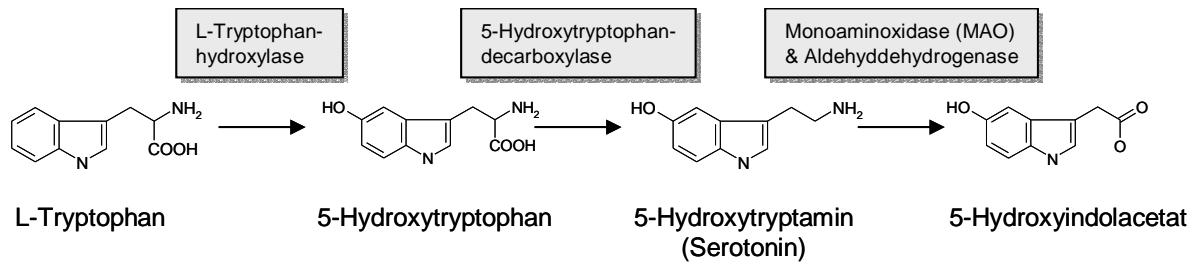


Abb. 3 Biosynthese und Abbau von Serotonin

Die Vermittlung der Wirkungen von 5-HT erfolgt über sieben verschiedene Rezeptortypen, die jeweils wiederum in 14 verschiedene Subtypen unterteilt sind. Alle 5-HT Rezeptoren gehören mit Ausnahme des 5-HT₃ Rezeptors zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Dagegen agiert der 5-HT₃-Rezeptor über einen Liganden gesteuerten Ionenkanal. In der Regel sind 5-HT Rezeptoren im postsynaptischen Bereich angesiedelt. Autorezeptoren auf der präsynaptischen Membran sind seltener. Im Gehirn wird 5-HT im Perikaryon der Nervenzellen synthetisiert und dann über das Axoplasma den Nervenendigungen zugeführt. Eine Speicherung erfolgt in Vesikeln, aus denen 5-HT bei Stimulierung in den synaptischen Spalt sezerniert wird (Barnes and Sharp, 1999). Eine Beteiligung an der Futteraufnahme wird dem 5-HT_{1A} und mehr noch dem 5-HT_{2C} Rezeptor zugesprochen. Dabei spricht vieles dafür, dass bei der 5-HT vermittelten Hyperphagie das Melanocortine System beteiligt ist. So ist z.B. auf POMC produzierenden Neuronen eine hohe 5-HT_{2C}-R Dichte zu verzeichnen (Heisler et al., 2003). Ein mögliches Modell zum Einfluss von 5-HT auf das Melanocortine System ist in Abb. 4 dargestellt.

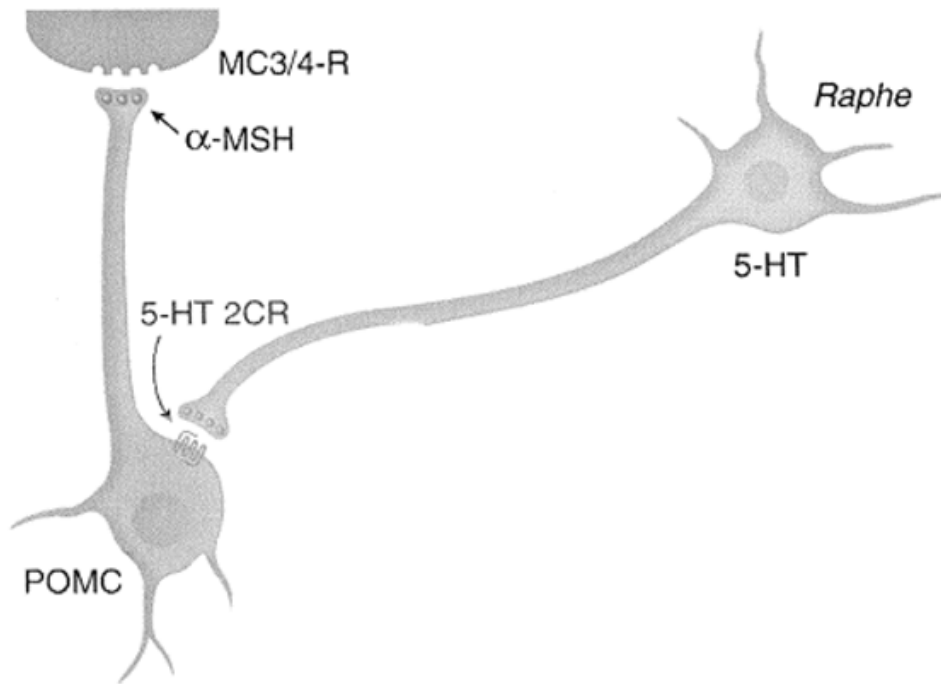


Abb. 4 Schematisches Modell der hypophagischen Eigenschaften von 5-HT und dessen Einfluss auf das zentrale Melanocortine System (nach Heisler et al.)

Allgemein führt die exogene Verabreichung von 5-HT bei Ratten zur Hypophagie (Bray and York, 1972). Zahlreiche Studien mit Dexfenfluramin/Phentermin (fen/phen), einem 5-HT freisetzenden Wirkstoff, führten ebenfalls zur Reduktion der Futtermittelaufnahme. Sibutramin, ein Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer führt bei zahlreichen Versuchstieren und beim Menschen ebenfalls zu einer verringerten Energieaufnahme. Die Verabreichung von 8-OH-DPAT, einem selektiven 5-HT_{1A} Rezeptor Agonisten führt bei ad libitum gefütterten Schweinen zur Steigerung der Futtermittelaufnahme, während bei restriktiv gefütterten Tieren eine Reduktion zu beobachten ist (Baldwin and De la Riva, 1995; Ebenezer et al., 1999a)

Wie bei diversen anderen Tieren, so ist auch beim Schwein die 5-HT Konzentration im ZNS von den Plasmagehalten an Tryptophan (Meunier-Salaun et al., 1991), oder genauer von dem Verhältnis Tryptophan:LNAAs abhängig (Henry et al., 1996). Einen direkten Einfluss der 5-HT Konzentration im Hypothalamus auf die Höhe der Futtermittelaufnahme konnte bisher allerdings nicht nachgewiesen werden (Henry et al., 1992). Vielmehr wurde ein Zusammenhang zwischen dem Verhältnis TRP:LNAAs und der Futtermittelaufnahme gefunden. Bei einem hohen Anteil an Tryptophan in der Ration und einer damit verbundenen hohen 5-HT Konzentration im Gehirn wurde im Gegensatz zu der allgemein verzehrsdepressiven Wirkung von 5-HT (Blundell, 1984), eine erhöhte Futtermittelaufnahme beim wachsenden Schwein festgestellt (Ettle and Roth, 2004; Henry et al., 1996). Dies könnte ein Hinweis auf eine

bedeutendere Rolle eines ausbalancierten Aminosäureverhältnisses im Vergleich zur zentralnervösen serotonergen Aktivität, auf die Futteraufnahme sein. Durch die dadurch bedingten höheren 5-HT Konzentrationen im Hypothalamus könnte es zu einem spezifischen Kohlenhydratappetit kommen und dadurch zu einer erhöhten Futteraufnahme beim Schwein. Dies würde in Übereinstimmung mit den Befunden einer spezifischen Appetithemmung von fettreichen Rationen durch zahlreiche pharmakologische Serotonin Agonisten stehen (Blundell et al., 1995). Hohe zentralnervöse 5-HT Konzentrationen führen zu einer selektiven Reduktion der Futteraufnahme und zu einer positiven Beeinflussung des Befindens. Deshalb ist anzunehmen, dass eine durch die Futteraufnahme bedingte, zentralnervöse „Serotonin-Belohnung“ in höherem Maße an der Entstehung von Übergewicht beteiligt ist (Wurtman and Wurtman, 1998).

2.5.4.2 Noradrenalin

Seit den Versuchen von Leibowitz et al., ist bekannt dass ein antagonistisches Prinzip der α - und β -noradrenergen Rezeptoren an der Futteraufnahme beteiligt ist. Die Aktivierung der α -adrenergen Rezeptoren im Hypothalamus führt dabei zur Hyperphagie, während die Aktivierung der β -adrenergen Rezeptoren durch Noradrenalin im Hypothalamus zu Sättigung bei Ratten führt. Die β -Rezeptoren sind hauptsächlich im lateralen Hypothalamus, also im Hungerzentrum lokalisiert und inhibieren dort nach Aktivierung die Futteraufnahme steigernden Neuronen. Die α -Rezeptoren sind hauptsächlich im VMH lokalisiert und hemmen dort, nach noradrenerger Aktivierung, die an der Sättigung beteiligten Prozesse (Leibowitz, 1970). Die gleichen Mechanismen scheinen ebenso an der Regulation der Wasseraufnahme beteiligt zu sein (Leibowitz, 1971).

Einen Einfluss des noradrenergen Systems auf die Futteraufnahme ist beim Schwein bisher unzureichend untersucht. Es gibt Hinweise, dass nach der hypothalamischen Injektion von DL-isopropanolol, einem β -Rezeptor Agonisten, eine kurzfristige Verminderung der Futteraufnahme erzielt wird. Durch die vorhergehende Injektion von DL-Propanolol, einem β -Rezeptor Antagonisten, konnte der hypophage Effekt von DL-Isopropanolol, aufgehoben werden (Jackson and Robinson, 1971).

2.6 Charakterisierung der Wirkungsweise von Sibutramin

Sibutramin ist ein selektiver Serotonin und Noradrenalin Wiederaufnahmehemmer. Das bedeutet, dass durch Sibutramin, die in den transsynaptischen Spalt abgegebenen Neurotransmitter, mit einer Verzögerung wieder in die Präsynapse aufgenommen wird und somit einen längeren Zeitraum zur Potentialerregung an der Postsynapse zur Verfügung stehen (Gundlah et al., 1997).

Darüber hinaus hemmt Sibutramin, wenn auch in einem geringeren Umfang, die Wiederaufnahme weiterer Monoamine wie z.B. Dopamin. Sibutramin wird sehr rasch zu zwei aktiven Metaboliten, dem Desmethyl-Sibutramin und dem Didesmethyl Sibutramin, metabolisiert. Diese sind ungefähr um den Faktor 100 wirkungsvoller als die Muttersubstanz. Mit zahlreichen Tiermodellen und in Humanstudien konnte gezeigt werden, dass Sibutramin die Nahrungsaufnahme senkt und den Grundumsatz, durch Steigerung der Thermogenese erhöht (Barkeling et al., 2003; Brown et al., 2001; Connoley et al., 1999; Hansen et al., 1998; Hauner et al., 2004; James et al., 2000). Dabei zeigten umfangreiche Untersuchungen, dass vor allem die β -adrenergen Rezeptoren, die $5\text{-HT}_{2A/2C}$ und teilweise auch die α -adrenergen Rezeptoren an den hypophagischen Effekten von Sibutramin beteiligt sind (Jackson et al., 1997). Als Folge davon reduziert sich das Körpergewicht und es treten zahlreiche Veränderungen von Blutparametern auf. Es reduziert sich die Konzentration von Leptin, Resistin und der Triglyceride im Plasma und die Konzentration von Harnsäure im Urin. Allerdings erhöhen sich die die HDL- und die Adiponektinkonzentration über einen längeren Zeitraum (Filippatos et al., 2005).

3 Material und Methoden

3.1 Tierversuche

Die Tierversuche wurden beim Regierungspräsidium Stuttgart nach TierSchG §8 beantragt und mit dem Thema „Pharmakologische Hemmung der Futteraufnahme durch Neuromodulatoren beim Schwein“ genehmigt.

Die Tierversuche gliedern sich in zwei Teile. Im ersten Teil des Projekts wurde der auf dem Markt befindliche Serotonin Noradrenalin Wiederaufnahmehemmer (Serotonin Noradrenalin Reuptake Inhibitor; SNRI), Sibutramin (Gundlah et al., 1997), auf seine Wirkung beim Schwein überprüft.

Im zweiten Projektteil wurde ein neuartiger MCH-R1 (melanin-concentrating hormone receptor 1) Antagonist der Fa. Boehringer Ingelheim (im folgenden Compound B4) auf seine stoffwechselphysiologischen Eigenschaften untersucht. Dabei wurde das im ersten Teil des Projekts entwickelte Schweinmodell verwendet.

3.1.1 Versuchstierhaltung

Alle Tiere wurden in Einzelbuchten (175 x 230 cm) gehalten. Die Buchtenabtrennung bestand aus vertikal angebrachten Stahlrohren, die einen lichten Abstand von 10 cm zueinander aufwiesen. Der Boden bestand aus isolierten Betonsegmenten. Eine dünne Schicht Einstreu aus Häckselstroh, diente zur Flüssigkeitsabsorption und zur teilweisen Befriedigung des Wühltriebs der Tiere. Die Tiere hatten ständig visuelle und akustische Kontaktmöglichkeiten. An den kurzen Seiten der Buchten waren halbschalenförmige Futtertröge mit den Maßen (20 x 70 x 20 cm) angebracht. Die Tränkebecken waren an den Längsseiten befestigt. Der Grundriss des Stallgebäudes und der Buchten ist in Abb. 5 wiedergegeben.

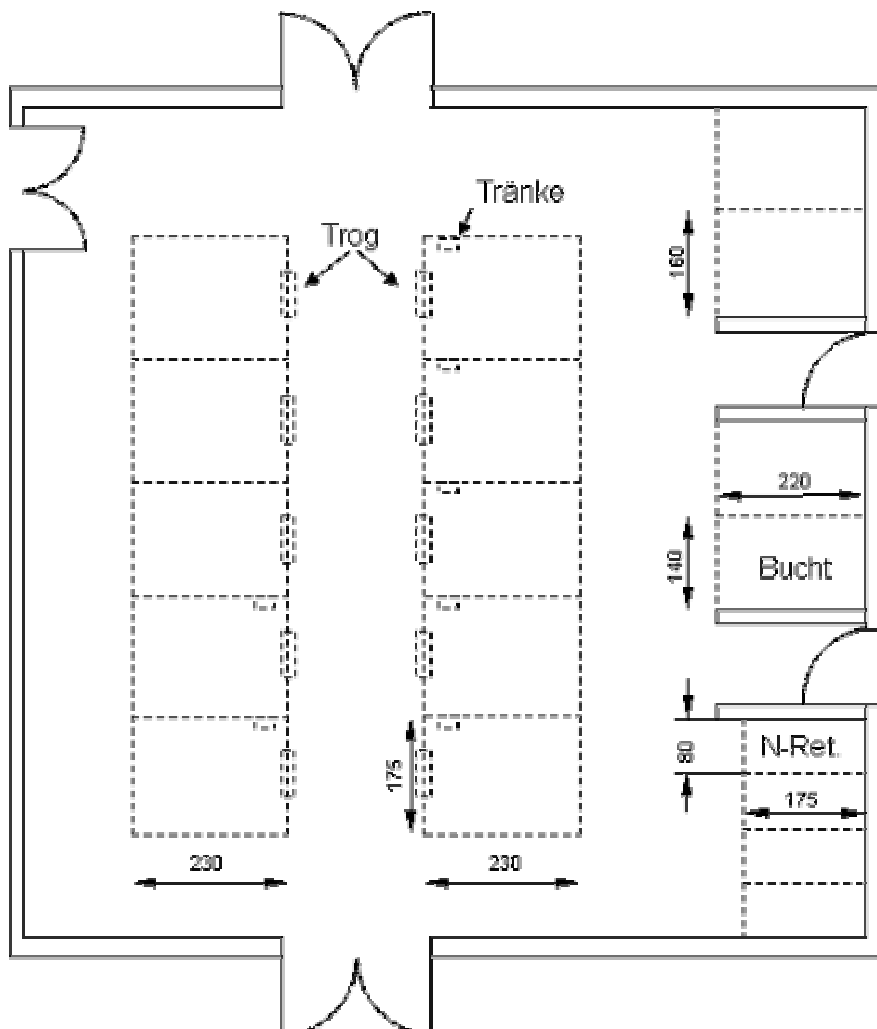


Abb. 5 Grundriss Versuchstierhaltung

3.1.2 Fütterung

Um einen erhöhten Fettansatz der Tiere zu provozieren, wurden diese zwei Tage nach dem Verlegen der Venenverweilkatheter, mit einer durch Pflanzenölzusatz auf 14,44 MJ/kg energetisch aufgewerteten Ration gefüttert. Die Rationszusammensetzung und der chemische Untersuchungsbefund der Gesamtration sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Die Futterzuteilung erfolgte im Versuchsteil „Sibutramin“ zweimal täglich mit je 2 kg um 8.15 Uhr und um 15.15 Uhr jeweils nach der Blutentnahme. Im Versuchsteil „Compound B4“ wurde dann, um eine exaktere Messung der Futteraufnahme sicher zu stellen, mindestens 30 % nicht gefressenes Futter angestrebt und daher je 3 kg den Tieren vorgelegt.

Tab. 3 Rationszusammensetzung und chemischer Untersuchungsbefund der energetisch aufgewerteten Futtration zur Provokation einer der Adipositas angenäherten Körperkonstitution

Ration (g/kg lufttrockene Substanz)	
Futtermittel	
Gerste	363,0
Triticale	190,0
Weizen	160,0
HP Sojaextraktionsschrot	150,0
Erbsenschrot	60,0
Pflanzenöl	50,0
Mineralfuttermischung	25,0
Kohlensaurer Futterkalk	2,0
Untersuchungsbefund	
Trockensubstanz	887,0
Rohprotein	158,0
Rohfett	69,0
Rohfaser	33,0
Rohasche	46,0
Stärke	446,0
Saccharose	36,0
Umsetzbare Energie (MJ ME/kg)	14,44

3.1.3 Methodik der Blutentnahme und Katheterpflege

Um frequente und belastungsfreie Blutentnahmen zu ermöglichen, wurde bei den Schweinen operativ ein Venenverweilkatheter nach dem Schema in Abb. 6 über die Vena cephalica verlegt (Claus et al., 1990b). Für eine ausführliche Beschreibung der Operationstechnik wird auf die Dissertation von C. Metz verwiesen (Metz, 2003).

Der operative Eingriff fand mindestens sieben Tage vor Start der Kontrollphase statt, sodass den Tieren eine ausreichende Rekonvaleszenzphase zur Verfügung stand.

Die Taschennähte und Katheteraustrittsstellen wurden direkt nach der OP mit Betaisadona-Salbe behandelt. Dabei wurden die Fäden und die Austrittsstelle mit Betaisadona bestrichen. Anschließend wurden die Fäden durch Ihre Stichkanäle hin- und her bewegt um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen. Zur weiteren Verringerung des Keimdrucks wurde Blauspray auf die OP-Nähte und die Taschenfäden gesprüht. Diese Behandlung erfolgte eine Woche post operativ täglich, danach angepasst an den Abheilungsprozess zwei- bzw. dreitägig mit Betaisadona-Salbe und einmal wöchentlich mit Blauspray. Die Behandlung der Wunden mit Klausan[®] (Dr. Schaette, Bad Waldsee) anstelle von Blauspray rief bei den Tieren Juckreiz hervor. Dadurch bedingt scheuerten die Tiere die OP-Stellen an den Buchtenabtrennungen bzw. am Boden, was dazu führen kann, dass infektiöse Keime in die Wunde gelangen. Daher wurde auf die Nachsorge mit Klausan zugunsten des Blausprays verzichtet.

Die Blutentnahme erfolgte standardisiert zweimal täglich um 8.00 Uhr und um 15.00 Uhr vor der Fütterung. Der Verweilkatheter und der Dreiwegehahn wurden nach jeder Blutentnahme mit 20 ml heparinierter Kochsalzlösung (0,9% NaCl, 0,1% Heparin) gespült, sodass der gesamte Katheter frei von Blutresten und mit Spüllösung gefüllt war. Der 3-Wege-Hahn wurde mit einer Lösung aus 70 % Ethanol mit 3 % H₂O₂ desinfiziert.

Außerdem wurde in allen Phasen jeweils eine zwölfstündige Intensivprobenahme (Window) durchgeführt. Hierbei werden über einen Zeitraum von zwölf Stunden (8.00 – 20.00 Uhr), in 20minütigem Abstand Blutproben gewonnen. Die Blutproben wurden sofort nach der Entnahme in heparinisierte Röhrchen überführt, auf Eis gekühlt und maximal 45 Minuten später zentrifugiert (15 Min.; 3000 U/min; 4°C). Der Überstand in Polystyrolröhrchen dekantiert und das Plasma bei -20°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren. Während der Intensivprobenahme wurden nur 10 ml Spüllösung mit 0,04 % Heparin verwendet. Sie wurde über einen Sterilfilter verabreicht, der nach vier Stunden ersetzt wurde. Der 3-Wege-Hahn wurde jede volle Stunde mit einer Lösung aus 70 % Ethanol ohne H₂O₂ Zusatz desinfiziert.

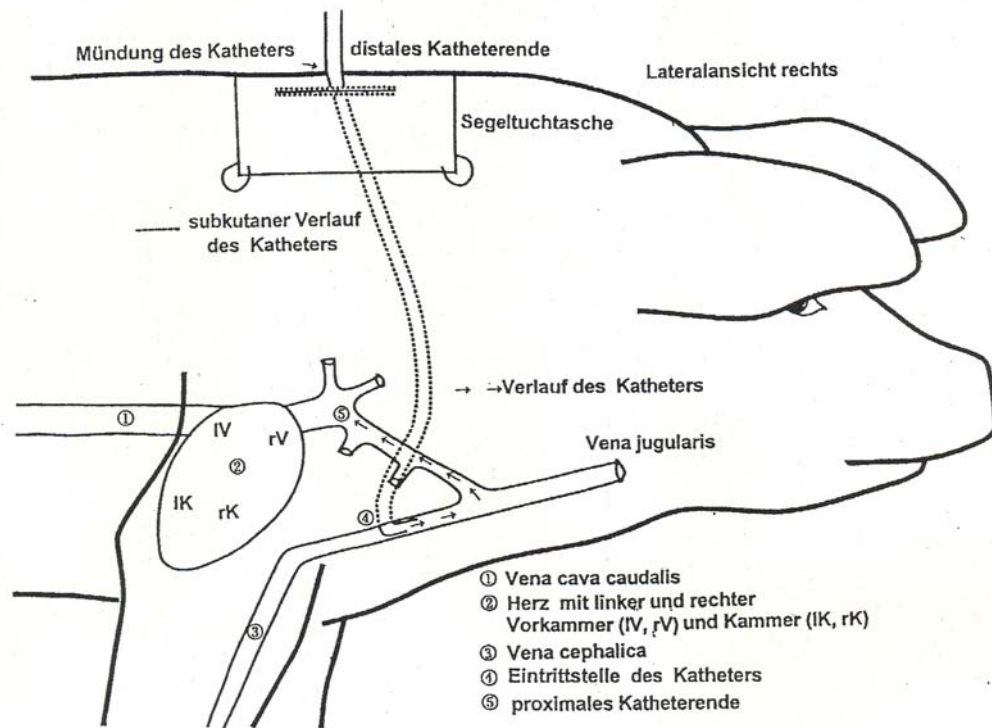


Abb. 6 Schema der Verlegung des cephalica Venenverweilkatheters und dessen Lage im Tier

3.1.4 Versuchsteil „Sibutramin“

3.1.4.1 Versuchsdesign

Dieser Versuchsteil wurde in zwei Durchgängen mit jeweils sechs Tieren durchgeführt. Dabei wurden die Tiere in eine Behandlungs- und eine Kontrollgruppe mit drei Tieren je Gruppe aufgeteilt. Der erste Durchgang fand vom 04.08. – 15.09.2004 und der zweite vom 02.02. - 15.03.2005 statt. Die Durchgänge wurden in drei Phasen aufgeteilt. Eine Phase dauerte 14 Tage. Eine Kontrollphase mit Placebogabe, eine Phase mit niedriger Dosierung und eine Phase mit hoher Dosierung. In den letzten vier Tagen jeder Phase wurden die Tiere in Stoffwechsellkäfigen aufgestellt. Der zeitliche Verlauf der Durchgänge ist in Abb. 7 dargestellt.

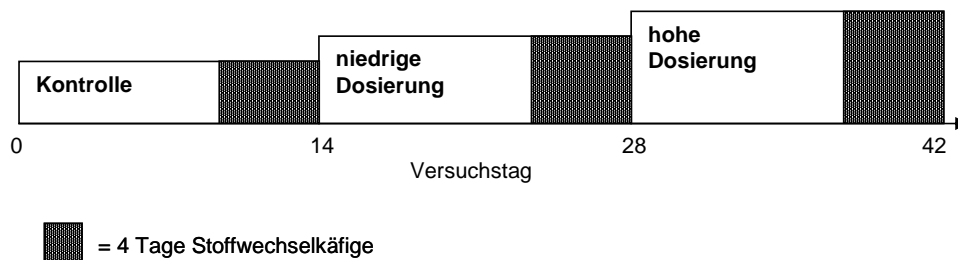


Abb. 7 Versuchsdesign zur Untersuchung von Sibutramin mit einer Kontrollphase, einer Behandlungsphase mit niedriger Dosierung und einer hohen Dosierung. Schwarz schraffiert sind die Zeiten in den Stoffwechsellkäfigen

3.1.4.2 Versuchstiere

Sämtliche Versuche wurden mit Schweinen der Rasse DL x Pit durchgeführt. Um geschlechtsspezifische Einflüsse auf die Futteraufnahme zu vermeiden, wurden Kastraten verwendet. Das durchschnittliche Alter der Tiere betrug bei Versuchsbeginn 162 ± 9 Tage. Dabei wiesen die Tiere eine durchschnittliche Lebendmasse von 92 ± 4 kg auf. Die Tiere wurden mindestens zehn Tage vor der Verlegung der Venenverweilkatheter von der Versuchstation Unterer Lindenhof bezogen und in der Experimentaleinheit des Fachgebiets in Hohenheim aufgestellt. Die Verlegung der Venenverweilkatheter erfolgte immer mindestens sieben Tage vor Versuchsbeginn.

3.1.4.3 Applikation von Sibutramin

Während des Sibutramin per os Durchgangs wurde den Tieren das Sibutramin in einer Dosierung von 10 mg/kg LM als niedrige Dosierung und 20 mg/kg LM als hohe Dosierung,

per os verabreicht. Diese Dosierung wurde aufgrund eines Vorversuchs gewählt und sollte den Blutplasmakonzentrationen von Sibutramin und seinen Metaboliten bei einer pharmakologischen Therapie beim Menschen angepasst werden (siehe 5.1). Bei der niedrigen Dosis fand die Verabreichung einmal täglich um 7.30 Uhr und bei der hohen Dosierung zweimal täglich um 7.30 und um 14.30 statt. Die geplante Applikationsform war, dass das in 0,5%igem Natrosol® gelöste Sibutramin, flüssig auf Löffelbiscuits aufgebracht wird und diese dann den Tieren zu fressen gegeben werden.

Aufgrund des bitteren Geschmacks der Substanz, verweigerten die Tiere die Sibutraminaufnahme allerdings nach kurzer Zeit (1-2 Tage). Um den Tieren einen neuen Fressanreiz zu bieten und doch noch eine geschmacksüberdeckende Trägersubstanz zu finden, musste die Dargebotsform deshalb innerhalb weniger Tage immer wieder geändert werden. Neben Natrosol und Löffelbiscuits wurden Brötchen, Pflanzenöl, Doppelkekse, Nuss-Nougat-Creme, Leberwurst, Quark, Joghurt und Remouladensoße auf Ihre Eignung als Trägersubstanz für Sibutramin überprüft. Bei keinem der genannten Träger konnte eine anhaltende Akzeptanz des Sibutramins durch die Tiere festgestellt werden. Eine mit Zwangsmaßnahmen (Oberkieferschlinge) in Verbindung mit einem ca. 20 cm langen Pillengeber verbundene Applikation des Sibutramins in Kapselform wurde aufgrund der Belastungssituation für die Tiere wieder eingestellt.

Aufgrund der Erkenntnisse des 1. Durchgangs wurde eine intravenöse Applikation des Sibutramins im 2. Durchgang vereinbart.

Hierfür wurde eine Sibutramin-Stammlösung in einer Konzentration von 2 g/l in 0,9%iger physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Die Dosierung wurde nach Durchführung einer Kinetikstudie, auf 0,5 mg/kg LM als niedrige Dosierung und auf 2 mg/kg LM als hohe Dosierung festgelegt. Mit der festgelegten Dosierung sollten die im 1. Durchgang gemessenen Konzentrationen von Sibutramin und seinen Metaboliten im Blutplasma erreicht werden.

Die Infusion von Sibutramin fand einmal täglich um 7.30 Uhr vor der Fütterung statt.

Die niedrige Dosierung (ca. 25 ml Sibutramin-Stammlösung) wurde den Tieren mit 0,5 ml/Sek mithilfe einer Spritze über einen Venenverweilkatheter (siehe Abb. 6) verabreicht. Dagegen kam bei der hohen Dosierung die am Fachgebiet für Tierhaltung & Leistungsphysiologie etablierte Methode einer Tropfinfusion mittels Infusomaten zum Einsatz. Diese wurden auf eine konstante Durchflussgeschwindigkeit von 200 ml/Std. eingestellt, sodass die Infusionsdauer für ca. 100 ml Sibutramin-Stammlösung etwa eine halbe Stunde betrug.

3.1.4.4 Erfassung des Körpergewichts, Futter- und Wasseraufnahme

Täglich um 7.30 Uhr wurde das nicht gefressene Futter des Vortags gewogen und daraus die tägliche Futteraufnahme berechnet. Die mittleren täglichen Futteraufnahmen wurden anschließend separat für die Zeit der Kontrolle, der niedrigen und der hohen Dosierung berechnet.

Die Tiere wurden zur Erfassung der Gewichtsentwicklung zweimal wöchentlich gewogen.

Der Wasserverbrauch wurde täglich mittels einer für jedes Tränkebecken installierten Wasseruhr erfasst. Die in diesem Versuchsteil eingesetzten Tränkebecken erwiesen sich im Nachhinein als ungeeignet, um eine exakte Messung der Wasseraufnahme durchzuführen. Ein nicht zu bestimmendes Wasservolumen wurde von den Tieren zum spielen und nicht zum saufen benutzt. Daraufhin kamen im folgenden Versuchsteil veränderte Tränkebecken zum Einsatz (siehe 3.1.5.4). Die daraus resultierenden Veränderungen der Wasseraufnahme sind im Ergebnisteil (siehe 4.1.5 und 4.2.5) zu beachten.

Die Messung des Körperfettgehalts mittels D₂O erforderte eine 12-stündige Futter- und Wasserkarenz. Daher wurden die Messergebnisse am Tag der D₂O-Applikation und an den drei darauf folgenden Tagen nicht in die Auswertung mit einbezogen.

3.1.4.5 Stoffwechselkäfige

Zur getrennten und verlustfreien Sammlung von Kot und Urin wurden die Tiere am Ende jeder Versuchsphase für vier Tage in Stoffwechselkäfigen aufgestellt. Die Grundfläche (180 x 80 cm) der Käfige bestand aus vollperforierten Tenderfoot Böden. Der Urin wurde über eine, unter den Tenderfoot Böden liegende, schräg abfallende Auffangwanne, in Kanistern gesammelt. Um Stickstoffverluste in Form von Gasen (z.B. Ammoniak) zu vermeiden, wurde der Urin mit 5M Schwefelsäure auf ca. pH 4 eingestellt. Der Kot wurde mehrmals täglich aus den Käfigen geholt und in verschließbaren Eimern gesammelt. Kot und Urin wurden als 24 Std. Probe um 8.00 gesammelt, gewogen und anschließend die Stoffwechselkäfige gereinigt. Nach Aliquotierung von je 10 ml Urin wurden Kot und Urin zu homogener Gülle verquirlt, ein aliquoter Teil genommen und die restliche Gülle verworfen. Die täglichen Gülleproben wurden mittels Kjeldahl-Verfahren auf ihren prozentualen Stickstoffgehalt untersucht.

3.1.5 Versuchsteil „MCH-R1 Antagonist Compound B4“

3.1.5.1 Versuchsdesign

In diesem Versuchsteil wurde der von der Boehringer Ingelheim GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellte MCH-R1 Antagonist Compound B4 an sieben Tiere verabreicht. Der

Versuch fand vom 20.09. - 01.11.2004 statt. Beim Versuchsablauf wurden die Erkenntnisse und Erfahrungen aus dem ersten Versuchsteil 3.1.4 mit berücksichtigt.

Auf die zeitweise Unterbringung der Tiere in Stoffwechselkäfigen wurde aufgrund des verzehrsdepressiven Effekts verzichtet. Der dadurch entstehende Informationsverlust zum Protein-Metabolismus wurde mit der Messung der Harnstoffkonzentration im Plasma kompensiert. Der zeitliche Ablauf entsprach ansonsten dem des ersten Versuchsteils, mit drei, jeweils vierzehntägigen Versuchsphasen (siehe Abb. 8).

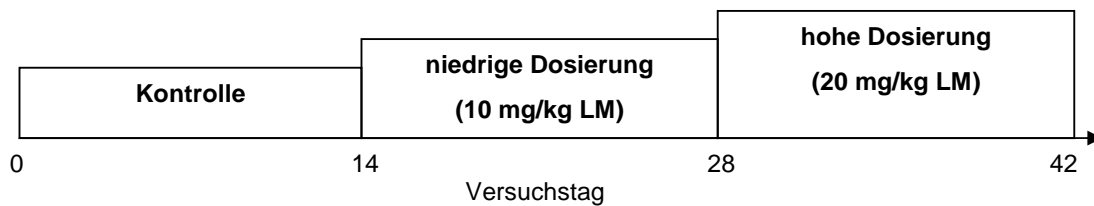


Abb. 8 zeitlicher Ablauf der Compound B4 Studie beim Schwein

3.1.5.2 Versuchstiere

Es kamen sieben Kastraten der Rasse DL x Pit zum Einsatz. Die Schweine hatten bei Versuchsbeginn ein durchschnittliches Alter von 153 ± 5 Tagen und eine durchschnittliche Lebendmasse von 89 ± 4 kg. Die Tiere wurden mindestens zehn Tage vor der Verlegung der Veneverweilkatheter von der Versuchsstation Unterer Lindenhof bezogen und in der Experimentaleinheit des Fachgebiets in Hohenheim aufgestellt. Die Verlegung der Venenverweilkatheter erfolgte elf Tage vor Versuchsbeginn.

3.1.5.3 Applikation von Compound B4

Compound B4 wurde in 0,5%igem Natrosol gelöst und den Tieren per os verabreicht. Dafür wurde unmittelbar vor der Verabreichung eine Stammlösung von 1g Compound B4 in 10ml 0,5%igem Natrosol frisch hergestellt. Diese Stammlösung wurde bei der niedrigen Dosierung mit 10 mg/kg LM und bei der hohen Dosierung mit 20 mg/kg LM den Tieren mittels einer Einwegspritze behutsam ins Maul gegeben. Die Dosierung wurde so gewählt, dass Sie ausreichend hohe Blutplasmakonzentrationen für eine pharmakologische Wirkung von Compound B4 sicherstellen sollte. Durch die anschließende Gabe eines Löffelbiscuits wurde das vollständige Abschlucken der Lösung sichergestellt.

3.1.5.4 Erfassung des Körpergewichts, Futter- und Wasseraufnahme

Die Erfassung der Lebendmasse erfolgte standardisiert zweimal wöchentlich, dienstags und donnerstags um 13.00 Uhr.

Die Futteraufnahme wurde durch wiegen des nicht gefressenen Futters ermittelt. Die Rückwaage fand zweimal täglich um 7.30 Uhr und um 15.00 Uhr statt.

Durch die Verwendung spezieller Tränkebecken (Suevia Mod. 85; Kirchheim am Neckar) konnten Wasserverluste minimiert werden. Die eigentliche Messung der aufgenommenen Wassermenge erfolgte durch eingebaute Wasseruhren einmal täglich präprandial um 7.30 Uhr.

3.2 Analytische Methoden

3.2.1 Bestimmung von Wachstumshormon im Blutplasma

Das im Hypophysenvorderlappen gebildete Wachstumshormon (GH) wird durch Feed-back-Mechanismen reguliert. Dabei hemmen auf hypothalamischer Ebene sowohl GH als auch IGF-I, die Freisetzung von GH-releasing hormon (GH-RH) und fördern Somatostatin. An der Regulation der GH Freisetzung sind des Weiteren die Neurotransmitter Dopamin, GABA, Adrenalin und Serotonin beteiligt (Harvey et al., 1995).

Die Messung des pGH fand aufgrund seiner proteinanabolen und seiner lypolytischen Wirkung und seines Einflusses auf die Futteraufnahme statt (Scanes, 1995).

Die Messung des porcinen GH im Blutplasma wurde mittels eines am Fachgebiet etablierten Radioimmunoassays im Doppelantikörperverfahren durchgeführt (Claus et al., 1990a).

Anstelle des dort beschriebenen Antikörpers kam das im Kaninchen erzeugte anti-pGH Antiserum vom NHPP (Dr. A.F. Parlow, NHPP; AFP422801Rb) zum Einsatz. Für dieses Antiserum ist eine Kreuzreaktivität von $< 0,1$ % gegen pPRL, pTSH, pFSH, und pLH angegeben. Das Antiserum wurde in einer Endverdünnung von 1 : 300.000 eingesetzt. Nach Zugabe des in EDTA-PBS-Puffer verdünnten Antiserums zu den Proben, folgte eine einstündige Inkubation bei RT.

Das pGH für die Markierung mit ^{125}I , für die Erstellung der Eichkurve und für die Zugabe zu den Kontrollproben wurde ebenfalls vom NHPP (Dr. A.F. Parlow; AFP10864B) bezogen.

Mittels einer Verdünnungsreihe wurden Kontrollproben mit 0 ng, 1,5 ng, 3 ng und 6 ng pGH/ml Kastratenblutplasma zur Überprüfung der Qualität des Assays hergestellt. Die Kontrollproben wurden in 200 μl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -18°C bis zur Verwendung gelagert und max. einmal aufgetaut. Diese Kontrollproben sowie eine hohe biologische Probe wurden in jedem Test gemessen und zur Charakterisierung der Qualitätskriterien herangezogen.

Qualitätskriterien: Die Intraassay Varianz betrug bei einer mit $1,23 \pm 0,04$ ng/ml pGH bestimmten biologischen Probe 3,4 %. Die gemittelte Interassay Varianz aller Kontrollproben und der hohen biologischen Probe betrug $15,3 \pm 4$ % (mean \pm SD). Die mittlere Wiederfindung betrug bei Zusätzen von 1,5; 3 und 6 ng/ml 97,1; 104,0 und 109,9 %.

Da pGH ein pulsatile Freisetzungsmuster aufweist, erfolgte die radioimmunologische Messung in den Proben der „12h Windows“ jeder Versuchsphase. Das pulsatile Freisetzungsmuster von pGH wurde über verschiedene Kriterien charakterisiert. Der Mittelwert aller Proben eines Tages spiegelt dabei das Niveau der Konzentration wieder.

Ein Puls wurde als Überschreitung des Mittelwerts um die doppelte Standardabweichung und anschließendem Abfall über mindestens zwei Werte definiert.

Der Basalwert wurde aus den acht niedrigsten Werten der Window Proben berechnet.

Der Maximalwert ergab sich aus dem Mittelwert der Pulse.

Die Differenz zwischen Maximal- und Basalwert lieferte die Amplitude.

Die Pulsfrequenz bezieht sich auf die gesamte Dauer des Windows (Pulse/12 Stunden).

3.2.2 Bestimmung von IGF-I im Blutplasma

Der insulinartige Wachstumsfaktor (IGF-I) wird in der Leber unter dem Einfluss von Wachstumshormon (Mathews et al., 1986) und Energie (Unterman et al., 1985) gebildet. Er initiiert in einer Vielzahl von Geweben die Zellproliferation und –differenzierung. Als Mediator (Somatomedin C) des Wachstumshormons besitzt IGF-I direkte anti-apoptotische (Fischer-Posovszky et al., 2004) und proliferative (Reddy, 1994) Wirkung auf diverse Gewebe.

IGF-I wurde prinzipiell mit einem etablierten Radioimmunoassay im Doppelantikörper-Verfahren bestimmt (Claus et al., 1992; Claus and Weiler, 1996). IGF-I ist im Blutserum an Bindungsproteine gebunden, die den Test stören würden. Daher mussten diese zunächst extrahiert werden (Baxter and Martin, 1986).

Abweichend von der beschriebenen Extraktion (Claus et al., 1992) wurde hier ein Blutplasmaaliquot von 50 µl mit 400 µl eines Säure-Alkohol-Gemisch versetzt, gut geschüttelt (Vortex) und 30 Min. bei RT inkubiert. Nach Abtrennung des denaturierten Proteins durch Zentrifugation (30 Min.; 2000U/min) wurden 100 µl des Überstands mit 40 µl 0,885 M Tris-Base neutralisiert und mit 500 µl IGF-I Puffer verdünnt. Für den eigentlichen Testansatz wurden 100 µl des extrahierten, verdünnten Neutralisationsgemischs verwendet.

Das IGF-I Antiserum wurde in einer Endverdünnung von 1 : 90.000 verwendet. Der IGF-I Standard wurde von GroPep bezogen. Um eine IGF-I Konzentration von 250 µg/ml zu erreichen, wurden 20 µg lyophilisiertes Peptid in 80 µl 10mM HCl gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Überprüfung der Qualität wurden mittels einer Verdünnungsreihe Kontrollproben mit 0 ng, 62,5 ng, 125 ng und 250 ng IGF-I (GroPep) versetzt und in jedem Test mitgeführt. Die

Kontrollproben wurden in 200 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -18°C bis zur Verwendung gelagert und einmal aufgetaut.

Qualitätskriterien: Die Intraassay Varianz betrug bei einer mit 138,8 ±7,7 ng/ml IGF-I bestimmten biologischen Probe 5,5 %. Die gemittelte Interassay Varianz aller Kontrollproben und der hohen biologischen Probe 6,6 ±4,2 % (mean ±SD). Die mittlere Wiederfindung betrug bei Zusätzen von 62,5 ng; 125 und 250 ng/ml 76,5; 82,0 und 66,9 %.

3.2.3 Bestimmung von Cortisol im Blutplasma

Cortisol ist das vorherrschende, von der NN-Rinde synthetisierte und abgesonderte primäre Glucocorticoid-Hormon beim Schwein. Cortisol ist an der Regulation des Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidstoffwechsel beteiligt und unterbindet allergische und entzündliche Reaktionen. Die Synthetisierung und Absonderung von Cortisol aus der NN-Rinde wird durch das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) gesteuert. Die ACTH-Absonderung erfolgt tagesrhythmisch vom Hypophysenvorderlappen als Reaktion auf die Absonderung des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH) vom Hypothalamus. Erhöhte ACTH-Konzentrationen stimulieren die Cortisol-Absonderung. Erhöhte Cortisolkonzentrationen unterbinden die CRH-Absonderung, was zu einer Unterbindung der ACTH-Absonderung führt. Dieser negative Feed-back Mechanismus führt zu niedrigen Cortisolkonzentrationen (Ruckebusch, 1991). Die 8.00 Uhr Plasmakonzentration von Cortisol kann über einen Zeitraum von 14 Tagen als Mittelwert verwendet werden (Janning, 1993). Die 8.00 Uhr Proben wurden daher zur Ermittlung der Blutplasmakonzentration von Cortisol gemessen.

Die Messung erfolgte prinzipiell in einem etablierten Radioimmunoassay mit Tritium (³H) markiertem Cortisol als Tracer (Claus and Weiler, 1996; Hoffmann et al., 1976). Da keine Kreuzreaktionen mit endogenem Progesteron im Blutplasma zu erwarten waren (Kastraten), wurde auf eine Vorextraktion mit Petroleumbenzin verzichtet. Zur Abtrennung von im Test störenden Bindungsproteinen, wie z.B. Transcortin, ist eine Extraktion der Proben und Kontrollen notwendig. Hierfür werden 10 µl Blutplasma mit 2 ml destilliertem Ethylacetat versetzt und eine halbe Stunde geschüttelt. Diese Extraktionsansätze werden anschließend bei -32°C für 45 Min. tiefgefroren. Die nicht gefrorene, cortisolhaltige Ethylacetatphase wird in 10 ml Reagenzgläser dekantiert und in einer Vakuumzentrifuge niedergetrocknet. Danach werden alle Proben in 100 µl PBS-Puffer aufgenommen und mit 500 µl Antikörperverdünnung (1 : 30.000) versetzt, 100 µl auf 10.000 cpm eingestelltes ³H-Cortisol zugegeben, gemischt (Vortex) und 20 Min. im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Zur

Stabilisierung der dynamischen Antigen-Antikörper-Bindungsreaktion folgt eine einstündige Inkubation im Eisbad bei 0° C. Die Bound-Free-Trennung beginnt mit Zugabe von 500 µl kalter 5%iger Kohlesuspension. Noch freies, nicht an AK gebundenes Cortisol wird adsorptiv an Kohle gebunden. Durch anschließende 20minütige Zentrifugation bei 4° C (3000 U/min) setzt sich die zugesetzte Kohle ab und der kohlefreie Überstand wird in Gefäße mit 5 ml Szintillatorflüssigkeit dekantiert. Zur Durchmischung werden die Szintillatorgefäße kurz geschüttelt und anschließend mittels β-Zähler die Radioaktivität des gebundenen ³H-Cortisols ermittelt (Zählzeit 2 Min.).

Qualitätskriterien: Das Verhältnis der Messung von 100 µl extrahiertem zu nicht extrahiertem Tracer ergibt die Wiederauffindung (WAF) in %. Dies macht eine Aussage über aufgetretene Extraktionsverluste. Die Messergebnisse der extrahierten Proben und Kontrollen werden um den Anteil der Extraktionsverluste rechnerisch bereinigt. Die mittlere Wiederauffindung des Tracers nach der Extraktion betrug 90 %.

Die Intraassay Varianz betrug bei einer mit 10,3 ±0,5 ng/ml Cortisol bestimmten biologischen Probe 4,4 %. Die gemittelte Interassay Varianz aller Kontrollproben betrug 8,5 ±4,1 % (mean ±SD). Die mittlere Wiederfindung betrug bei Zusätzen von 10 ng; 25; 50 und 75 ng/ml 107,1; 116,3; 113,9 und 111,9 %.

3.2.4 Bestimmung von Aldosteron im Blutplasma

Aldosteron ist ein Steroidhormon, das aus Cholesterin gebildet wird und zu den Mineralocorticoiden gehört. Mineralocorticoide steigern die Rückresorption von Natriumionen in den Verbindungstubuli und Sammelrohren der Niere. Parallel dazu kommt es zu einer gesteigerten Ausscheidung von Kalium-, Wasserstoff und Ammoniumionen, was zu einer Abnahme der Kaliumkonzentrationen im Serum führt. Eine besonders hohe Dichte von Aldosteronrezeptoren findet sich in den corticalen Abschnitten der Sammelrohre, darüber hinaus im Colon und den Schweißdrüsen. Die Wirksamkeit von Aldosteron auf den Mineralhaushalt ist etwa 1000 mal höher als die von Cortisol, weil das Cortisol in den aldosteronsensitiven Zellen durch die 11-β-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2 zu Cortison umgewandelt wird und den Rezeptor nicht aktivieren kann. Die Rezeptoraffinität ist gleich. Aldosteron wird gelegentlich auch als Dursthormon bezeichnet, da es bei Flüssigkeitsmangel vermehrt ausgeschüttet wird.

Aldosteron wurde aufgrund seines Einflusses auf den Wasserhaushalt und speziell der Wasseraufnahme gemessen.

Bei der Messung von Aldosteron im Blutplasma kam prinzipiell ein am Fachgebiet etablierter Radioimmunoassay zum Einsatz (Lopes et al., 2004). Abweichend davon wurde ein Volumen von 400 µl Blutplasma mit 4 ml destilliertem Ethylacetat zur Einfachextraktion verwendet.

Qualitätskriterien: Die mittlere Wiederfindung von 100 µl extrahiertem Tracer betrug 76 %. Die Interassay Varianz betrug bei der Probe mit einem definierten Zusatz von 300 ng/ml Aldosteron 17,7 %.

3.2.5 Bestimmung von Harnstoff in Urin und Blutplasma

Harnstoff ist das Endprodukt und Exkret des Stickstoffwechsels der Säuger und damit auch des Schweins. Bei proteinreicher Ernährung und nach der Futteraufnahme steigt die Harnstoffbildung an. Die Blutharnstoffkonzentration wurde als Parameter für die Proteinverwertung gemessen (Berschauer, 1977).

Harnstoff wird durch Urease zu Ammoniak umgesetzt. Glutamat Dehydrogenase bewirkt den NADH-abhängigen Umsatz dieses Ammoniaks mit Ketoglutarat zu Glutamat. Die NADH Abnahme ist der Harnstoffkonzentration proportional. Die Kalibrierung erfolgt mittels Harnstoffstandardlösungen (Talke and Schubert, 1965). Das Verfahren ist am Fachgebiet etabliert (Lopes et al., 2004). Um in den optimalen Messbereich der Eichkurve zu gelangen, wird das Blutplasma 1 : 4, der Urin mit 1 : 100 mit Aqua_{bidest.} verdünnt. Von dieser verdünnten Probe werden 10 µl im Doppelansatz auf Mikrotiterplatten in den Test gebracht, mit 200 µl Reagenzienmix und 10 µl GIDH-Lösung versetzt und zur Entfernung von eventuell vorhandenem Ammoniak 10 Minuten bei RT auf dem Schüttler (Vortex) inkubiert. Danach wird die Extinktion bei 340 nm/690 nm im Mikrotiterplattenreader gemessen. Im Anschluss daran wird 10 µl Urease-Lösung zugegeben, die Mikrotiterplatte erneut 20 Minuten geschüttelt (Vortex) und danach bei 340 nm/690 nm im Mikrotiterplattenreader gemessen. Aus den Extinktionsdifferenzen der Eichpunkte wird eine Eichgerade ermittelt und die Messwerte unter Verwendung der Eichgerade berechnet.

3.2.6 Bestimmung von Glucose im Blutplasma

Die Glucosekonzentrationen im Blutplasma wurden photometrisch in Mikrotiterplatten bestimmt. Bei dem angewandten Verfahren wird die Glucose enzymatisch durch Glucoseoxidase (GOD) zu Gluconsäure oxidiert, wobei Wasserstoffperoxid entsteht. Dieses wiederum reagiert, katalysiert durch Peroxidase mit 2,2azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) zu einem grünen Farbstoff. Von diesem wird die Extinktion, photometrisch bei 405 nm bestimmt. Um in den optimalen Messbereich der Eichkurve zu gelangen, wird das Blutplasma 1 : 20 verdünnt und geschüttelt (Vortex). Von dieser verdünnten Probe und der Eichkurve werden 25 µl im Doppelansatz in Mikrotiterplatten überführt. Anschließend wird 200 µl Farbreagenz zugegeben und der Ansatz durch schütteln der Mikrotiterplatte von Hand gemischt. Es folgt eine Inkubation bei 30°C im Trockenschrank. Danach wird die Extinktion bei 340 nm/405 nm im Mikrotiterplattenreader gemessen (Lopes et al., 2004).

3.2.7 Bestimmung des Körperfettgehalts

Die Ermittlung des Körperfettgehalts fand während des 1. Durchgangs sowohl durch die wöchentliche Messung der Rückenspeckdicke mittels Ultraschall (*in vivo*), als auch durch die standardisierte Zerlegung der rechten Schlachtkörperhälfte nach der DLG-Schnittführung statt (*post mortem*).

Die Teilstücke und das Flomen wurden gewogen. Anschließend das subkutane Fett der Teilstücke Schinken, Kotelett, Kamm, Bug und Backe mit einem Messer abpräpariert und ebenfalls gewogen. Der Anteil des subkutanen Fetts an den Teilstücken wurde als subkutanes Fett (%) in die Auswertung mit einbezogen. Des Weiteren wurde die Rückenspeck- und Muskeldicke zwischen der 3./4. letzten Rippe gemessen (*post mortem*).

Wird Fett aus Depots für Energiezwecke abgebaut, dann findet eine Einlagerung von Wasser, anstelle von Fett in die Adipocyten statt (Kirchgeßner, 1997). Diese Veränderung im Fettgewebe konnte mit den im 1. Durchgang angewendeten Methoden nicht erfasst werden. Außerdem werden durch die Messung der Höhe der Fettauflage bzw. des Gewichts des subkutanen Fetts, keine Aussagen über den gesamten Körperfettgehalt gemacht. Deshalb wurde im 2. Durchgang die Methode zur Erfassung der Körperzusammensetzung mittels Deuteriumoxid (D₂O) am Fachgebiet etabliert (Susenbeth, 1984). Aufgrund der höheren Genauigkeit und der größeren Aussagefähigkeit der Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels Deuteriumoxid im Vergleich zur Zerlegung wurde ab dem 2.

Durchgang (M-, S-Tiere) auf das Zerlegen der Schlachtkörperhälften verzichtet und nur noch die Rückenspeck- und Muskeldicke zwischen der 3./4. letzten Rippe gemessen (post mortem).

Im zweiten Durchgang wurde die Schätzung der Körperzusammensetzung mittels D₂O freundlicherweise von Frau Miriam Goerke im Rahmen Ihrer Bachelor-Arbeit durchgeführt. Da diese Methode neu etabliert werden musste, wird Sie an dieser Stelle ausführlicher beschrieben.

3.2.7.1 Messung des Körperwassers mit Hilfe von D₂O

Prinzipiell wurde das Verfahren wie von (Tissier et al., 1983) erstmalig beschrieben und von (Susenbeth, 1984) in Hohenheim optimiert, durchgeführt.

Den Tieren wird 15 Stunden vor der D₂O Gabe das Futter und mit der D₂O Gabe das Wasser entzogen. Unmittelbar vor der Infusion wird die Lebendmasse der Tiere erfasst. Die exakte Verabreichung des ca. 70%igen D₂O (0,25-0,65 g 70%iges D₂O/kg LM) erfolgt mit 20 ml Einwegspritzen über die Venenverweilkatheter, die vor und nach der Infusion gewogen werden. Anschließend wird der Katheter mit 40 ml physiologischer NaCl- Lösung welche mit 2g Heparin /l versetzt ist nachgespült und der Dreivegehahn mit 70%igem Ethanol abgewaschen. Die Blutprobennahme (30 ml) erfolgt nach Erreichen des Verteilungsgleichgewichts 4; 4,5 und 5 Std. nach der D₂O Verabreichung. Das Blut wurde in heparinisierte 10 ml Röhrchen überführt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Gewinnung des Blutwassers wird 5 ml Vollblut vakuumgefriergetrocknet und das sublimierte Blutwasser in einer bei -80°C mit flüssigem Stickstoff umgebenen Kühlfalle aufgefangen. Das so gewonnene Blutwasser wird wieder aufgetaut und in Plastikgefäßen bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Der D₂O Gehalt in dem so gereinigten D₂O-H₂O-Gemisch wird mit einem Infrarot-spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 3960 nm gegen Wasser bestimmt (Institut für Tierernährung, Universität Hohenheim). Am Anfang jeder Bestimmungsserie wurde viermal Wasser und einmal jeder Eichpunkt bestimmt, dann sämtliche Proben und am Ende noch einmal jeder Eichpunkt und Wasser.

3.2.7.2 Berechnung der Körperzusammensetzung

Mit Hilfe der Messung des Körperwasseranteils kann die chemische Körperzusammensetzung, d.h. der Gehalt an Wasser, Fett, Protein und Asche *in vivo* geschätzt werden (Groves and Wood, 1965; Wood and Groves, 1963). Diese Schätzung, beruht auf der Kenntnis der Zusammensetzung der fettfreien Körpersubstanz. Diese weist eine

konstante, bekannte Abhängigkeit von der Körpermasse auf und wird vom Körperfettgehalt nicht beeinflusst. Durch die Messung des vorliegenden D₂O Gehalts im Blutwasser und der verabreichten D₂O Menge lässt sich das Körperwasser berechnen. Daraus kann im anschließend die Berechnung der fettfreien Körpersubstanz und des Proteins erfolgen. Das Körperfett wird aus der Differenz zwischen Körpermasse und fettfreier Körpersubstanz berechnet (siehe Abb. 9). Zur Errechnung des Leerkörpers wurde der Magen-Darm-Harnblaseninhalte (MDH) geschätzt.

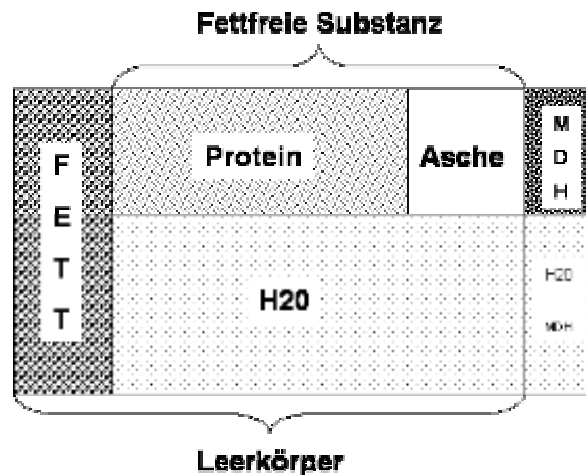


Abb. 9 Schematische Darstellung der dem Verfahren zugrunde liegenden Körperzusammensetzung (nach Goerke, 2004).

Der Berechnung wurden folgende Gleichungen zugrunde gelegt (Susenbeth, 1984):

$$\text{Lebendkörperwasser (kg)} = \frac{\text{D}_2\text{O appliziert (g)}}{\text{D}_2\text{O Gehalt im Blutwasser (g/kg)}} - 0,025 * \text{LM}$$

$$\text{Leerkörperwasser (\%)} = \left[\frac{\text{kg Lebendkörperwasser} - \text{kg H}_2\text{O MDH}}{\text{kg LM} - \text{kg MDH}} \right] * 100$$

$$\text{Fettfreie Körpersubstanz (FFS \%)} = \left[\frac{\text{Leerkörperwasser (\%)}}{82,43 * \text{LM}^{-0,0219}} \right] * 100$$

$$\text{MDH (kg)} = [225 - 5,4 \text{ N} + (12 \text{ XF} - 60)] * [1 + 0,0065 * (\text{IT} - 95)] * \left[\frac{\text{LM}^{0,75}}{1000} \right]$$

$$\text{H}_2\text{O MDH (kg)} = 0,82 * \text{MDH (kg)}$$

Legende:

N = Nüchterungsdauer in Std.

XF = Rohfaser der TS in %

IT = Futtertrockensubstanzaufnahme in g am Tag / kg LM^{0,75}

Der Rohfasergehalt wird nur bei Werten die höher als 5 % liegen mit berücksichtigt.

3.2.8 Bestimmung der Schilddrüsenhormone T3, T4 und TSH im Blutplasma

Das Hormon Trijodthyronin (3,5,3'-L-Triiodthyronin, T3) wird zu etwa 20% von der Schilddrüse selbst produziert und sezerniert und entsteht zu etwa 80% durch periphere Konversion von T4 zu T3 in der Leber und Niere (T3-Neogenese). Das Hormon Thyroxin (3,5,3',5'-L-Tetraiod-Thyronin, T4) wird von der Schilddrüse produziert und sezerniert. Beide Hormone sind bei der Regulierung des Stoffwechsels von grundlegender Bedeutung und tragen zu einer Erhöhung des Grundumsatzes bei. Die Sekretion von T3 und T4 in den Kreislauf wird durch das Hypophysenhormon TSH (Thyreoida-stimulierendes Hormon) angeregt. T3 hat eine höhere physiologische Wirksamkeit als T4. Das im Kreislauf zirkulierende T3 ist zu 99,7%, T4 zu 99,95% reversibel an Transportproteine gebunden. Im Wesentlichen handelt es sich dabei um das Thyroxin-bindende Globulin (TBG), in geringerem Maße auch um Albumin und das Thyroxin-bindende Präalbumin (TBPA). Ungebundenes oder freies T3 und T4 ist metabolisch aktiv, während gebundenes T3 und T4 inaktiv ist und als Hormonreserve angesehen werden kann (Löffler and Petrides, 2003).

Das Hypophysenhormon TSH ist, ein als Dimer aufgebautes Glykoprotein. Die α -Untereinheit mit 92 Aminosäuren ist nahezu identisch mit der α -Untereinheit der

Hypophysenhormone LH und FSH. Die β – Untereinheit mit 110 Aminosäuren ist einzigartig und für die spezifischen biochemischen und immunologischen Eigenschaften des Hormons verantwortlich. Die Assoziation der beiden Untereinheiten ist jedoch die Voraussetzung für die biologische Aktivität des Hormons. TSH geht mit spezifischen Zellrezeptoren an der Oberfläche der Schilddrüsenzellen eine Wechselbeziehung ein und entfaltet seine Wirkung auf zweierlei Weise. Zum einen wird die Hypertrophie der Schilddrüsenzellen stimuliert. Zum anderen reguliert TSH alle Einzelschritte der Sekretion von T3 und T4 in der Schilddrüse.

Die freien Formen der unter TSH-Einwirkung in der Schilddrüse vermehrt produzierten und sezernierten Schilddrüsenhormone T3 und T4 sind für die negative Rückkopplungsreaktion verantwortlich. Sie hemmen sowohl die TRH (TSH-releasing hormone) Sekretion auf Hypothalamusebene als auch die TSH-Sekretion auf Hypophysenniveau (Löffler and Petrides, 2003).

Zur Messung der Schilddrüsenhormone T3, T4 und TSH wurden die gefrorenen Blutplasmaproben an das Labor Biocontrol (biocontrol, Labor für veterinärmedizinische Untersuchungen, Konrad-Adenauer-Straße 17, 55218 Ingelheim) übersandt. Dort wurden die Proben im ADVIA[®] Centaur[™] System von Bayer gemessen. Die folgende Testbeschreibung findet daher lediglich in allgemeiner, nicht konkreter Form statt.

Der ADVIA Centaur T3/T4 Test ist ein kompetitiver Immunoassay unter Anwendung der direkten Chemilumineszenz-Technologie. T3/T4 in der Probe konkurriert mit T3/T4, das kovalent an paramagnetische Partikel in der flüssigen Phase gebunden ist, um eine begrenzte Menge von Acridiniumester markierten monoklonalen Maus-Anti-T3 bzw. T4 Antikörper im Lite-Reagenz. Zwischen der Menge an T3/T4 in der Probe und den vom System gemessenen relativen Lichteinheiten (RLUs) besteht eine umgekehrt-proportionale Beziehung.

Der ADVIA Centaur TSH-Assay ist ein Immunoassay mit direkter Chemilumineszenz-Technologie, bei dem jeweils konstante Mengen zweier Antikörper eingesetzt werden. Der erste Antikörper befindet sich im Lite-Reagenz und ist ein monoklonaler Maus-Anti-hTSH-Antikörper, markiert mit Acridiniumester. Der zweite Antikörper befindet sich in der flüssigen Phase und ist ein polyklonaler Schaf-Anti-hTSH-Antikörper, der kovalent an paramagnetische Partikel gebunden ist. Zwischen der Menge an TSH in der Probe und den vom System gemessenen relativen Lichteinheiten (RLUs) besteht ein proportionales Verhältnis.

3.2.9 Bestimmung von Sibutramin, Desmethyl-Sibutramin und Didesmethyl-Sibutramin im Blutplasma

Sibutramin und dessen Metaboliten im Blutplasma wurde von Dr. Lotz (Boehringer Ingelheim GmbH, Biberach, Deutschland), nach Proteinfällung mit Acetonitril im Blutplasma mittels HPLC-MS/MS bestimmt (O'Connor et al., 2002). Nach Proteinfällung wurde der Überstand vakuumgetrocknet und in einem Wasser-Acetonitril-Methanol Gemisch (6:1:1) mit 0,1 %igem Ameisensäurezusatz wieder aufgenommen. Die Kalibrierung erfolgte mittels eingesetztem Sibutramin als Standard und eines Übergangs von 280,3>124,8 m/z . Die Gehalte von Desmethyl-Sibutramin und Didesmethyl-Sibutramin wurden mit einem MRM (multiple reaction monitoring) Übergang von 266,3>124,8 m/z und 252,3>124,8 m/z unter Berücksichtigung der Kalibrierung auf Sibutramin mit den von ihnen erwarteten Peakflächen geschätzt.

3.2.10 Bestimmung von „Compound B4“ im Blutplasma

Compound B4 im Blutplasma wurde von Dr. Lotz (Boehringer Ingelheim GmbH, Biberach, Deutschland), nach Proteinfällung mit Acetonitril im Blutplasma mittels HPLC-MS/MS bestimmt (O'Connor et al., 2002). Als Standard wurde die an die Tiere verabreichte Originalsubstanz Compound B4 verwendet.

3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch gemischte lineare Modelle des Statistical Package for the Social Science (SPSS Version 12.0.1; Chicago, IL, USA). Die arithmetischen Mittelwerte der Phasen Kontrolle, der niedrigen Dosierung und der hohen Dosierung wurden als wiederholte Messungen des Subjekts „Tier“ angegeben. Der Faktor „Tier“ wurde als zufällig und die Gruppe, Durchgang und Phase sowie die Wechselwirkungen als feste Effekte definiert. Für die Wiederholung kam die autoregressive Kovarianzstruktur erster Ordnung mit homogenen Varianzen (AR1) zum Einsatz. Es wurden paarweise Vergleiche (paarweiser t-test) der LSmeans der Haupteffekte Phase, Durchgang und Gruppe mit LSD Verfahren durchgeführt. Die Modellanpassung fand durch Residualanalyse mittels Streudiagramm und Q-Q Plot statt.

Grundlage der angegebenen Signifikanzen sind folgende Wahrscheinlichkeiten:

Irrtumswahrscheinlichkeit	Bedeutung	Symbolisierung
$p > 0,05$	nicht signifikant	ns
$p \leq 0,05$	signifikant	*
$p \leq 0,01$	sehr signifikant	**
$p \leq 0,001$	hoch signifikant	***

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsteil „Sibutramin“

4.1.1 Konzentration von Sibutramin, Desmethyl-Sibutramin und Didesmethyl-Sibutramin im Blutplasma

Die Konzentration von Sibutramin, Desmethyl-Sibutramin und Didesmethyl-Sibutramin wurde im Blutplasma nach in 3.2.9 beschriebenen Methode bestimmt. Die Messung eines 24stündigen Zeitfensters der Blutplasmaproben vom 11.09.2003 (*per os*; n = 3) und vom 03.03.2004 (i.v.; n = 2) ergab folgende Werte. Dabei ist zu beachten, dass während der 20mg/kg *per os* Applikation am 11.09.2003, Sibutramin zweimal täglich um 7.30 Uhr und um 14.30 verabreicht wurde.

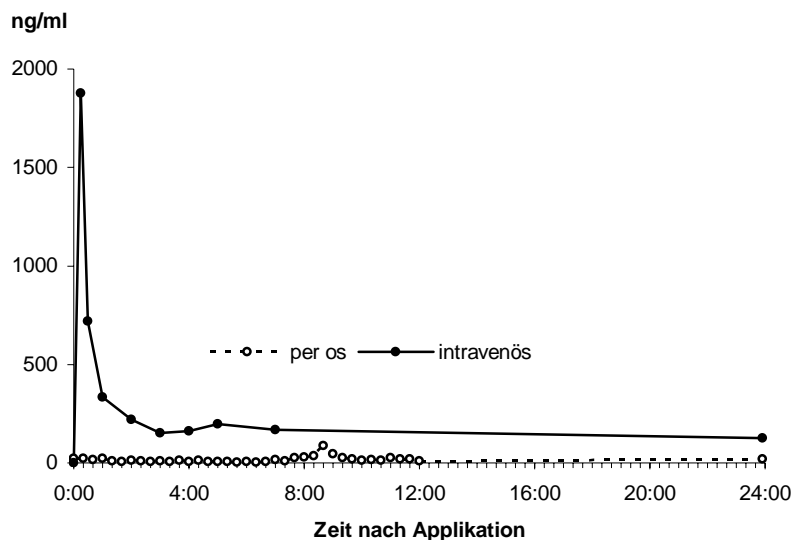


Abb. 10 Verlauf der Sibutraminkonzentrationen in einem 24stündigen Zeitfenster bei hoher Dosierung *per os* [20 mg/kg] oder i.v. [2mg/kg] (mean).

Die Sibutraminkonzentration zeigte bei *intravenöser* Applikation, trotz einer niedrigeren Dosierung (2 mg/kg LM), einen unmittelbaren steilen Anstieg auf eine maximale Konzentration (C_{\max}) von 1899 ng/ml bei einem Mittelwert von 472 ng/ml; währenddessen die *per os* Applikation trotz der höheren Dosierung (20 mg/kg LM) zu einem C_{\max} von nur 82 ng/ml nach der 14.30 Uhr Gabe, bei einem Mittelwert von 17 ng/ml führte.

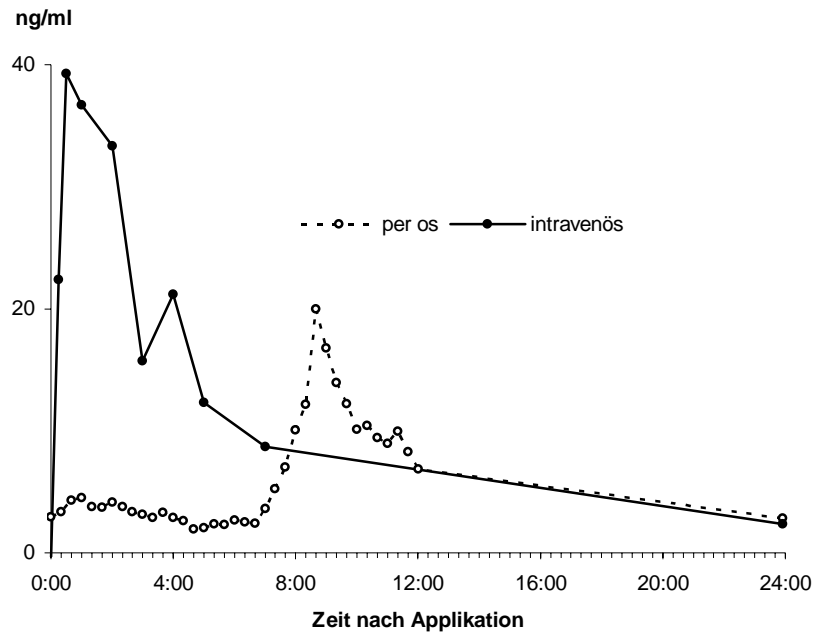


Abb. 11 Verlauf der Desmethyl-Sibutraminkonzentration in einem 24stündigen Zeitfenster bei hoher Dosierung *per os* [20mg/kg] oder *i.v.* [2mg/kg] (mean). Sibutraminapplikation erfolgte zum Zeitpunkt 0:00.

Sibutramin ist ein tertiäres Amin, das *in vivo* über einen extensiven First-Pass-Metabolismus in der Leber zu einem sekundären Amin, dem Desmethyl-Sibutramin, und danach weiter zu einem primären Amin, Didesmethyl-Sibutramin, demethyliert wird (Hind et al., 1999). Der Konzentrationsverlauf des ersten Metaboliten Desmethyl-Sibutramin (M1) ist in Abb. 11 dargestellt. Bei der *i.v.* Applikation kam es, wie auch schon bei der Muttersubstanz Sibutramin, zu einem raschen Anstieg von M1 auf einen $C_{\max} = 39,3$ ng/ml bei einem Mittelwert von 21,3 ng/ml. Der Anstieg bei der *per os* Applikation war, ebenfalls ähnlich wie bei der Muttersubstanz, hauptsächlich nach der Verabreichung um 14.30 Uhr auf einen $C_{\max} = 20$ ng/ml und einen Mittelwert von 6,1 ng/ml.

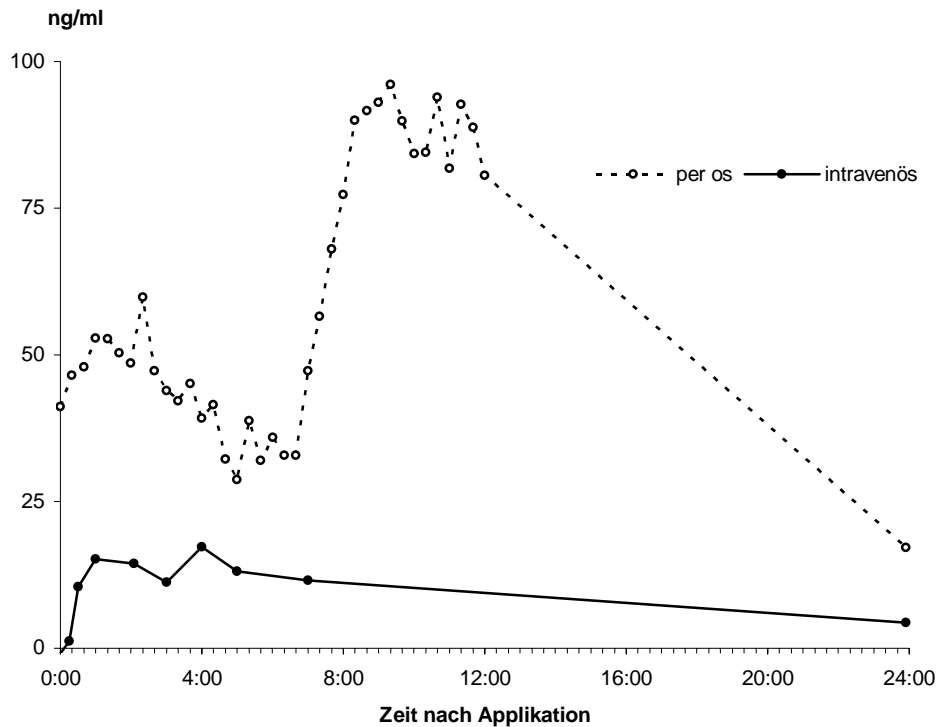


Abb. 12 Verlauf der Didesmethyl-Sibutraminkonzentrationen in einem 24stündigen Zeitfenster bei hoher Dosierung *per os* [20 mg/kg] oder *i.v.* [2 mg/kg] (mean). Sibutraminapplikation erfolgte zum Zeitpunkt 0:00.

Der Verlauf des zweiten Sibutramin Metaboliten, dem primären Amin Didesmethyl-Sibutramin (M2) zeigte den in Abb. 12 dargestellten Verlauf. Dabei ist im Gegensatz zu M1 und Sibutramin, eine höhere C_{max} der *per os* Tiere nach der Verabreichung um 14.30 Uhr, im Vergleich zu den *i.v.* Tieren (96 ng/ml vs. 17 ng/ml) erkennbar. Dem entsprechend ist der Mittelwert von M2 der *per os* Tiere mit 59 ng/ml im Vergleich zu den *i.v.* Tieren mit 11 ng/ml ebenfalls höher.

Eine pharmakokinetische Charakterisierung der unterschiedlichen Applikationsformen fand durch die Auswertung der Fläche unter der Konzentrations-/Zeitkurve statt (AUC = area under the curve). Die Ergebnisse sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4 AUC in ng x h x mL⁻¹ für Sibutramin, Desmethyl-Sibutramin und Didesmethyl-Sibutramin nach einer p.o. (10mg/kg) oder i.v. (2mg/kg) Applikation.

	AUC (ng x h x mL ⁻¹)		
	Sibutramin	Desmethyl-Sibutramin (M1)	Didesmethyl-Sibutramin (M2)
<i>per os</i> (20 mg/kg)	49	33	513
intravenös (2 mg/kg)	3853	239	225

Die AUC Werte von Sibutramin und M1 im Blutplasma waren nach *intravenöser* Applikation im Vergleich zur *per os* Applikation höher. Dabei steht beim Sibutramin, *per os* appliziert eine AUC von 49 einer AUC von 3853 bei *i.v.* Applikation gegenüber. Diese viel höheren AUC Werte bei *i.v.* Applikation setzten sich bei M1 fort. Dort steht bei *per os* ein AUC von 33 einem AUC von 239 bei *i.v.* gegenüber.

Im Gegensatz dazu zeigte sich die ca. doppelt so hohe AUC von M2 nach *per os* Applikation. Bei diesem zweiten Metaboliten beträgt die AUC nach *per os* Gabe 513, während die AUC nach *i.v.* Gabe bei nur 225 lag.

Aufgrund der beachtlichen pharmakokinetischen Unterschiede zwischen den beiden Applikationsformen werden die Ergebnisse der Sibutramin Versuchs, nach ihrer Applikationsform getrennt betrachtet.

4.1.2 Futtermittelaufnahme

Zur Erfassung der täglichen ad libitum Futtermittelaufnahme wurde das nicht gefressene Futter einmal täglich um 7.30 Uhr vor der nächsten Fütterung rückgewogen. Der Verlauf des Mittelwerts der täglichen Futtermittelaufnahme während des *per os* Sibutramin Durchgangs ist für die Behandlungsgruppe in Abb. 13 und für die Kontrollgruppe in Abb. 14 dargestellt.

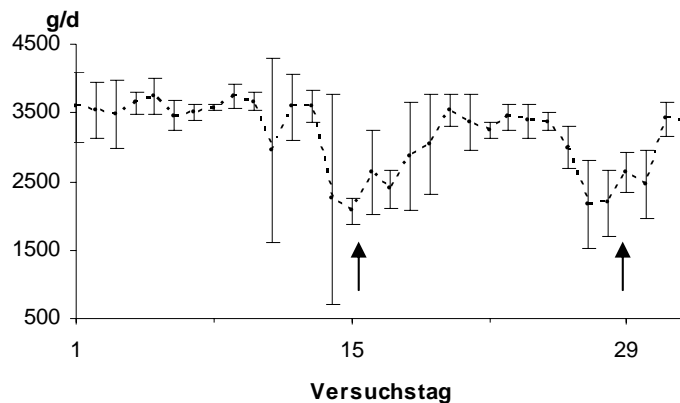


Abb. 13 Verlauf der täglichen Futtermittelaufnahme (mean \pm S.E.M.) der Sibutramin Gruppe (n = 3) während des Sibutramin *per os* Durchgangs

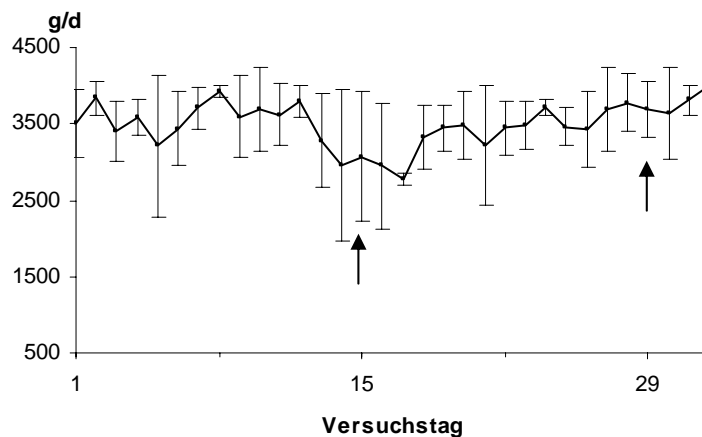


Abb. 14 Verlauf der täglichen Futtermittelaufnahme (mean \pm S.E.M.) der Placebogruppe (n = 3) während des Sibutramin *per os* Durchgangs

Die tägliche Futtermittelaufnahme war während den Zeiten in denen die Tiere in den Stoffwechselkäfigen (mit Pfeil gekennzeichnet) untergebracht waren, stark reduziert. Hierbei konnte vor allem in der Zeit der hohen Dosierung von Sibutramin eine starke Reduktion

festgestellt werden, wohingegen bei der Placebogruppe keine durch die Stoffwechselkäfige bedingte Reduktion, in dieser Phase festzustellen war.

Die varianzanalytische Auswertung der mittleren täglichen Futtermittelaufnahme über den *per os* Versuchszeitraum ist in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5 LSmeans der mittleren täglichen Futtermittelaufnahme in Gramm pro Tag bei *per os* Applikation von Sibutramin (n = 3)

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	3532 ^a	3584 ^a	ns
10 mg/kg	3217 ^a	3416 ^a	ns
20 mg/kg	2705 ^b	3767 ^a	*

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 177.

Innerhalb der *per os* Sibutramingruppe zeichnete sich eine deutlich sinkende mittlere tägliche Futtermittelaufnahme im Verlauf der Behandlung mit Sibutramin ab. Dabei war die Futtermittelaufnahme zwischen der Phase der hohen Dosierung und der Phase der niedrigen Dosierung ($p = 0,021$) bzw. der Kontrollphase ($p = 0,001$) signifikant reduziert. Trotz einer, bei allen Tieren sinkenden Futtermittelaufnahme, während der Phase der niedrigen Dosierung im Vergleich zur Kontrollphase, konnte mit dem gewählten statistischen Modell kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Phasen festgestellt werden ($p = 0,108$). Die stark reduzierte Futtermittelaufnahme in der Phase der hohen Dosierung, führte letztendlich auch zu einem signifikanten Unterschied zwischen der Placebo- und Sibutramingruppe ($p = 0,004$) in dieser Phase (siehe Tab. 5).

Der Verlauf des Mittelwerts der täglichen Futtermittelaufnahme während des intravenösen Sibutramin Durchgangs ist für die Sibutramin Gruppe in Abb. 15 und für die Placebogruppe in Abb. 16 dargestellt.

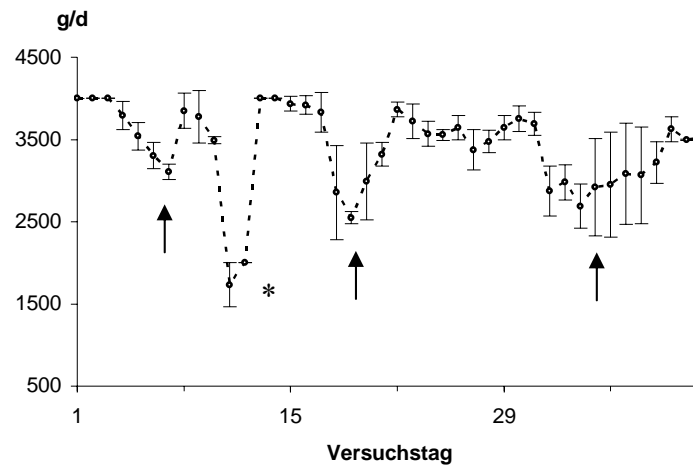


Abb. 15 Verlauf der täglichen Futtermittelaufnahme (mean \pm S.E.M.) von mit Sibutramin behandelten Tieren (n = 2) während des Sibutramin *intravenös* Durchgangs

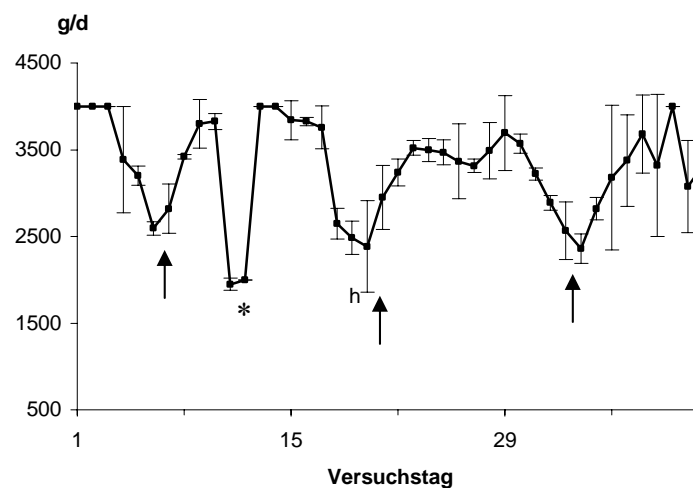


Abb. 16 Verlauf der täglichen Futtermittelaufnahme (mean \pm S.E.M.) von mit Placebo behandelten Tieren (n = 2) während des Sibutramin *intravenös* Durchgangs

Die Futtermittelaufnahme ist, in den Zeiten der Unterbringung der Tiere in den Stoffwechselkäfigen (mit Pfeil gekennzeichnet), reduziert (siehe Abb. 15 und Abb. 16). Dabei ist kein Unterschied zwischen der Sibutramin Gruppe und der Placebogruppe in der Verlaufskurve ersichtlich. Da

die Futtermittelaufnahme durch die methodischen Anforderungen der D₂O-Methode (mit * gekennzeichnet) an Tag 13 und an den drei darauf folgenden Tagen verändert ist, wurden diese bei der Berechnung der Phasenmittelwerte nicht berücksichtigt.

Die varianzanalytische Auswertung der mittleren täglichen Futtermittelaufnahme über den *intravenös* Versuchszeitraum ist in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6 LSmeans der mittleren täglichen Futtermittelaufnahme in Gramm pro Tag bei *intravenöser* Applikation von Sibutramin (n = 2)

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	3429 ^{ab}	3307 ^a	ns
0,5 mg/kg	3509 ^a	3306 ^a	ns
2 mg/kg	3074 ^b	3066 ^a	ns

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 116.

Innerhalb des *intravenös* Versuchsdurchgangs, traten sowohl bei der Sibutramin- als auch bei der Placebogruppe eine Reduktion der mittleren täglichen Futtermittelaufnahme während des Zeitraums der hohen Dosierung auf. Allerdings ist diese nur innerhalb der Sibutramin-Gruppe zwischen der Phase der niedrigen und der hohen Dosierung signifikant ($p = 0,027$) reduziert. Zwischen der Kontrollphase und der Phase der hohen Dosierung ist die Futtermittelaufnahme zwar reduziert, wenngleich auch nicht signifikant ($p = 0,072$).

Innerhalb der Placebogruppe konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Phasen festgestellt werden. Ebenso wenig ist die Futtermittelaufnahme zwischen den Gruppen innerhalb der Phasen signifikant voneinander unterschieden (siehe Tab. 6).

4.1.3 Gewichtsentwicklung

Zu Beginn der Kontrollphase des *per os* Versuchs lag das Gewicht der Sibutramingruppe bei 91,9 kg und das der Placebogruppe bei 90 kg. Am Ende der Kontrollphase und damit am Beginn der Phase der niedrigen Dosierung von Sibutramin betrug die Gewichte 101,3 kg bei der Sibutramingruppe und 99,7 kg bei der Placebogruppe. Auch am Ende der niedrigen Dosierungsphase von Sibutramin konnte mit Gewichten von 119,9 kg für die Sibutramingruppe und 119,3 kg für die Placebogruppe kein Effekt auf den Gewichtsverlauf festgestellt werden. Diese Entwicklung änderte sich dann jedoch für die Phase der hohen Sibutramindosierung, an deren Ende die Tiere der Sibutramingruppe ein Gewicht von 123 kg und die Placebogruppe ein Gewicht von 124,7 kg aufwiesen (mean; n=3). Bei der Betrachtung der Gewichtsverlaufskurve in Abb. 17 konnte allerdings kein Unterschied zwischen den Placebo und den Sibutramintieren festgestellt werden.

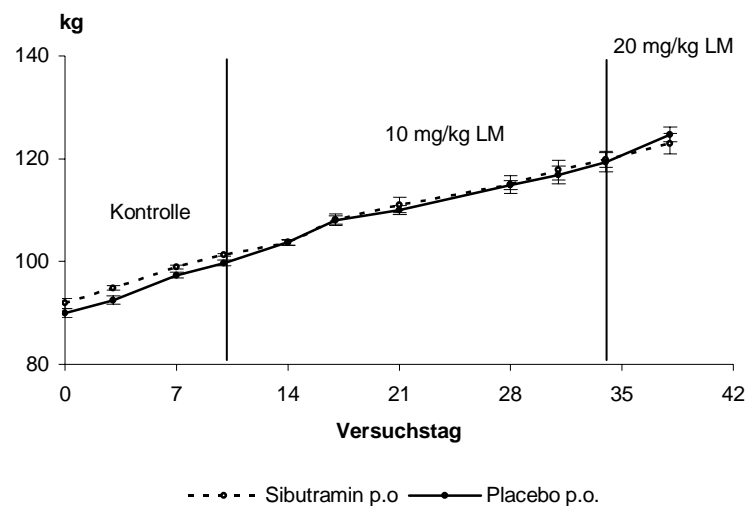


Abb. 17 Gewichtsverlaufskurve der *per os* Versuchsgruppe (mean \pm SEM) von mit Sibutramin behandelten Tieren (n = 3) und von Tieren, die mit derselben Trägersubstanz aber ohne Wirkstoff behandelt wurden, Placebo (n = 3).

Die Auswertung der Gewichtsentwicklung erfolgte neben der Betrachtung der Gewichtsverlaufskurven noch mit den mittleren täglichen Zunahmen der einzelnen Behandlungsphasen. Eine Übersicht der mittleren täglichen Zunahmen der Kontroll-, niedrigen- und hohen Dosierungsphase ist für den *per os* Durchgang in Tab. 7 und für den *intravenösen* Durchgang Tab. 8 enthalten.

Die Varianzanalyse der mittleren täglichen Zunahme ergab während der *per os* Applikation von Sibutramin weder signifikante Effekte der Gruppe, der Phase noch der Wechselwirkungen zwischen Gruppe und Phase.

Tab. 7 LSmeans der mittleren täglichen Zunahme in Gramm pro Tag bei *per os* Applikation von Sibutramin (n = 3)

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	937 ^a	970 ^{ab}	ns
10 mg/kg	774 ^a	818 ^a	ns
20 mg/kg	783 ^a	1350 ^b	*

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 124.

Innerhalb der *per os* Sibutramingruppe war eine, wenn auch nicht signifikante Verringerung der mittleren täglichen Zunahme von 937 g/d in der Kontrollphase auf 774 g/d bzw. 783 g/d in den Behandlungsphasen erkennbar. Im Vergleich dazu blieb die mittlere tägliche Zunahme innerhalb der *per os* Placebogruppe in der Kontrollphase und der Phase der niedrigen Dosierung konstant, bzw. wurde eine signifikante Erhöhung der mittleren täglichen Zunahme zwischen dem Zeitraum der hohen Dosierung und dem Zeitraum der niedrigen Dosierung ermittelt ($p = 0,021$). Während der Phase der hohen Dosierung konnte mit 738 g/d bei den Sibutramintieren zu 1350 g/d bei den Placebotieren eine signifikant höhere tägliche Zunahme ($p = 0,007$) bei den Placebotieren im Vergleich zu den mit Sibutramin behandelten Tieren festgestellt werden (siehe Tab. 7).

Während des *intravenösen* Versuchsdurchgangs lag das mittlere Gewicht der Sibutramintiere bei 97,1 kg und das der Placebotiere bei 95,2 kg (mean; n=2). Nach der Kontrollphase wogen die Sibutramintiere durchschnittlich 106,2 kg und die Placebotiere 103 kg. Nach der vierzehntägigen Phase der niedrigen Dosierung wogen die Sibutramintiere 120,9 kg, während die Placebotiere bei 115,4 kg lagen. Nach einer weiteren vierzehntägigen Phase der hohen Dosierung lagen die Gewichte bei 133,3 kg (Sibutramin i.v.) zu 128,0 kg (Placebo i.v.). Der Verlauf der Gewichtsentwicklung ist in Abb. 10 dargestellt.

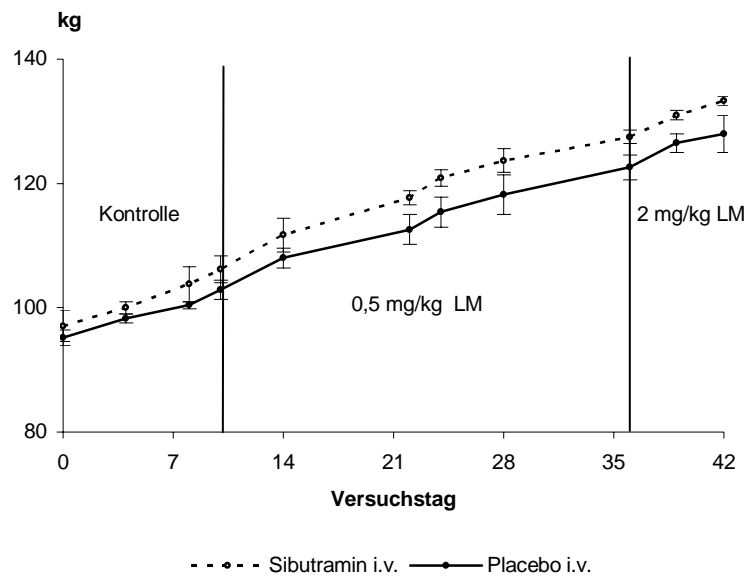


Abb. 18 Gewichtsverlaufskurve der *intravenös* Versuchsgruppe (mean \pm SEM) von mit Sibutramin behandelten Tieren (n = 2) und von Tieren, die mit derselben Trägersubstanz aber ohne Wirkstoff behandelt wurden, Placebo (n = 2).

Die Varianzanalyse der mittleren täglichen Zunahme ergab während der intravenösen Applikation von Sibutramin weder signifikante Effekte der Gruppe, der Phase noch der Wechselwirkungen zwischen Gruppe und Phase.

Tab. 8 LSmeans der mittleren täglichen Zunahme in Gramm pro Tag bei intravenöser Applikation von Sibutramin (n=2)

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	910 ^{ab}	775 ^a	ns
0,5 mg/kg	1050 ^a	889 ^a	ns
2 mg/kg	689 ^b	700 ^a	ns

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 135.

Die mittleren tägl. Zunahmen zeigten innerhalb der Sibutramin i.v. Gruppe zunächst eine nicht signifikante Zunahme von 910 g/d auf 1050 g/d. Diesen hohen Zunahmen während der Phase der niedrigen Dosierung, folgte eine signifikante Reduktion auf 689 g/d während der Phase der hohen Dosierung ($p = 0,047$). Demgegenüber waren die Veränderungen innerhalb der Placebogruppe nicht signifikant voneinander unterschieden. Auch der Vergleich zwischen den Gruppen ergab keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Phase, wenngleich auch die Unterschiede der tägl. Zunahmen innerhalb der Phase der niedrigen Dosierung zwischen der Sibutramingruppe (1050 g/d) und der Placebogruppe (889 g/d) beachtlich sind (siehe Tab. 8).

4.1.4 Futtermittelverwertung

Die Futtermittelverwertung wurde in Gramm Futtermittelaufnahme pro kg Lebendmassezunahme für jedes Tier in allen drei Versuchsphasen berechnet. Die LSmeans des *per os* Versuchsdurchgangs sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9 LSmeans der Futtermittelverwertung in Gramm Futter pro kg Lebendmassezunahme bei *per os* Applikation von Sibutramin (n = 3)

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	3891 ^a	3724 ^{ab}	ns
10 mg/kg	4193 ^a	4298 ^a	ns
20 mg/kg	3858 ^a	2897 ^b	ns

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 404.

Aufgrund der, im Vergleich zu den anderen Phasen, niedrigen Futtermittelverwertung von 2897 Gramm Futter pro Kilogramm Lebendmassezunahme, unterschied sich nur die Phase der hohen Dosierung innerhalb Placebogruppe signifikant ($p = 0,03$) von der Phase der niedrigen Dosierung innerhalb der Placebogruppe. Ansonsten konnte keine einheitliche Veränderung der Futtermittelverwertung innerhalb des Sibutramin *per os* Durchgangs festgestellt werden (siehe Tab. 9).

Die Futtermittelverwertung innerhalb des intravenösen Sibutramin Durchgangs ist in Tab. 10 dargestellt.

Tab. 10 LSmeans der Futtermittelverwertung in Gramm Futter pro kg Lebendmassezunahme bei *intravenöser* Applikation von Sibutramin (n = 2)

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	3773 ^a	4865 ^a	ns
0,5 mg/kg	3358 ^a	3741 ^a	ns
2 mg/kg	4551 ^a	4406 ^a	ns

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 781.

Bei der Futtermittelverwertung während des i.v. Durchgangs konnte trotz, zum Teil beachtlicher Unterschiede, keine signifikante Veränderung, weder zwischen den Phasen- noch zwischen den Gruppenmittelwerten festgestellt werden. Die Ursache dafür lag an der uneinheitlichen Entwicklung der Futtermittelverwertung sowohl zwischen den Phasen als auch zwischen den Einzeltieren der Gruppe.

4.1.5 Wasserverbrauch

Der Verlauf des Wasserverbrauchs während des Sibutramin *per os* Durchgangs zeigte keine eindeutige Entwicklung im Hinblick auf eine durch Sibutramin bedingte Erhöhung oder Reduzierung der Wasseraufnahme. Allerdings ist ein bemerkenswerter absoluter Niveauunterschied zwischen der Sibutramin- und der Placebogruppe zu beachten (siehe Abb. 19).

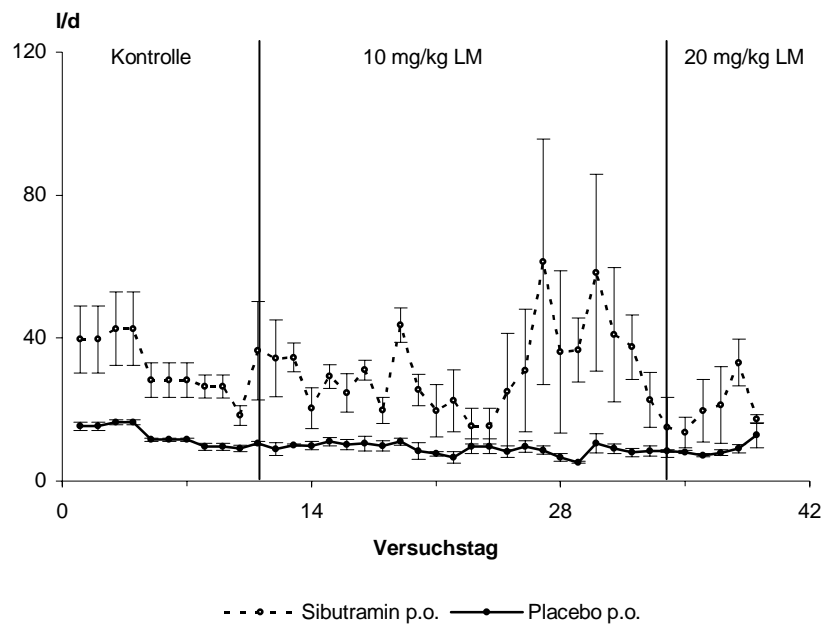


Abb. 19 Verlauf der Wasseraufnahme von Tieren mit *per os* Sibutramin Applikation (n = 3) und Tieren denen ein Placebo appliziert wurde (n = 3)

Die LSmeans des Wasserverbrauchs innerhalb der Phasen und Gruppen sind in Tab. 11 dargestellt.

Tab. 11 LSmeans des mittleren täglichen Wasserverbrauchs (l/d); bei *per os* Applikation von Sibutramin

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	32,0 ^a	12,6 ^a	*
10 mg/kg LM	30,7 ^{ab}	9,1 ^a	**
20 mg/kg LM	21,0 ^b	9,0 ^a	*

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 3,6.

Die varianzanalytische Untersuchung der Phasen Mittelwerte zeigte, dass sich die tägl. Wasseraufnahme der Sibutramingruppe in allen Phasen signifikant von der Placebogruppe unterscheidet. Eine signifikante Reduktion des tägl. Wasserverbrauchs, von 32 auf 21 Liter pro Tag, war außerdem zwischen der Kontrollphase und der Phase der hohen Dosierung innerhalb der Sibutramingruppe zu erkennen. Bei den Werten ist zu beachten, dass der Wasserverbrauch der Sibutramingruppe mit 32 bis 21 Liter pro Tag auf einem Niveau liegt, das ca. 10 bzw. 20 Liter über der normalen täglichen Wasseraufnahme (Forbes, 1995) und dem der Placebogruppe liegt (siehe Tab. 11).

Während des *intravenösen* Sibutramin Durchgangs zeigte der Verlauf der täglichen Wasseraufnahme keine offensichtlichen Unterschiede, weder zwischen den Phasen noch zwischen den Gruppen. Eine Ausnahme davon bildeten zwei Spitzenwerte an Tag 38, 39 und Tag 49 bei den mit Sibutramin behandelten Tieren. Hier kommt es zu einem Anstieg des Wasserverbrauchs auf bis zu 25 l/d (siehe Abb. 20 und Abb. 21).

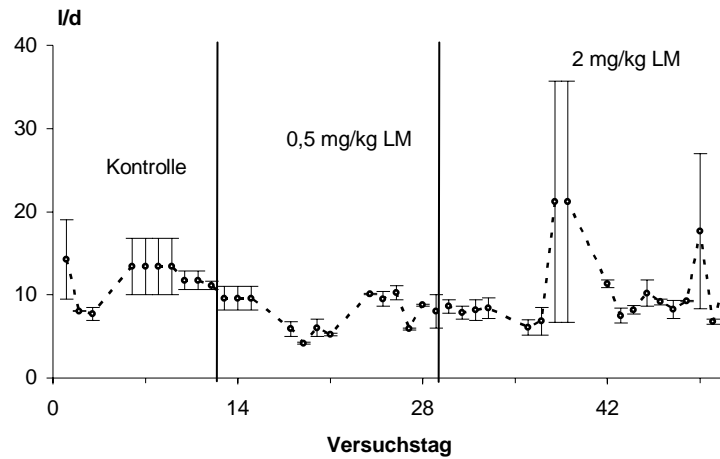


Abb. 20 Verlauf der Wasseraufnahme von Tieren mit intravenöser Sibutramin Applikation (n = 2)

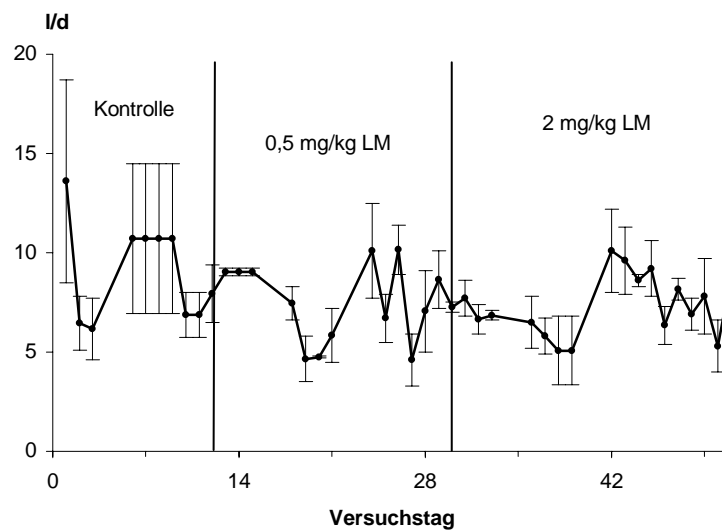


Abb. 21 Verlauf der Wasseraufnahme von Tieren mit intravenöser Place Applikation (n = 2)

Die Ergebnisse der varianzanalytischen Untersuchung der Mittelwerte der täglichen Wasseraufnahme, innerhalb der Phasen und Gruppen während des *intravenösen* Sibutramin Durchgangs sind Tab. 12 dargestellt.

Tab. 12 LSmeans des mittleren täglichen Wasserverbrauchs (l/d) bei intravenöser Applikation von Sibutramin (n = 2)

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	13,5 ^a	9,3 ^a	ns
0,5 mg/kg LM	8,2 ^b	7,4 ^a	ns
2 mg/kg LM	10,5 ^{ab}	7,3 ^a	ns

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 1,8.

Es zeigte sich eine leicht erhöhte Wasseraufnahme der intravenös mit Sibutramin behandelten Tiere, im Vergleich zu den Tieren, die mit einem Placebo behandelt wurden. Allerdings ist die Differenz zwischen den Mittelwerten der Gruppe innerhalb der Phase geringer als während des Sibutramin *per os* Durchgangs, so dass auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden konnte. Ebenfalls auffällig ist, dass die Sibutramintiere mit 13,5 Litern pro Tag in der Kontrollphase ihren höchsten Wasserverbrauch aufweisen, zu einem Zeitpunkt an dem sie noch gar kein Sibutramin appliziert bekommen. In der Phase der niedrigen Dosierung kam es dann, zu einer im Vergleich zur Kontrollphase, signifikanten Reduktion des Wasserverbrauchs auf 8,2 l/d ($p = 0,042$). In der Phase der hohen Dosierung steigt der Wasserverbrauch auf 10,5 l/d und ist damit weder von der Kontrollphase noch von der Phase der niedrigen Dosierung signifikant verschieden (siehe Tab. 12).

4.1.6 Körperfettgehalt

Die Ermittlung der Körperzusammensetzung im Sibutramin *per os* Durchgang erfolgte sowohl durch die Messung der Speck- und Muskeldicke, post mortem, im Bereich der 3./4. letzten Rippe, als auch durch den prozentualen Anteil des subkutanen Fetts bezogen auf die abgespeckten Teilstücke. Die ebenfalls durchgeführte Messung der Rückenspeckdicke mittels Ultraschall, ergab dieselben Werte wie die post mortem gemessenen Werte und wird deshalb nicht gesondert aufgeführt.

Tab. 13 mittlere Speck- und Muskeldicke sowie prozentualer Anteil subkutanen Fett im *per os* Durchgang (mean \pm S.E.)

	Sibutramin	Placebo
Speckdicke (mm)	17,7 \pm 2,0	17,5 \pm 0,9
Muskeldicke (mm)	79,7 \pm 7,1	76,3 \pm 3,5
subkutanen Fett (%)	19,4 \pm 0,4	19,8 \pm 0,9

Die mittlere Speck- und Muskeldicke und der prozentuale Fettanteil des *per os* Sibutramindurchgangs ist in Tab. 13 wiedergegeben. Eine Abweichung der Körperzusammensetzung zwischen den Gruppen kann aus den gemessenen Werten nicht abgeleitet werden.

Tab. 14 Prozentualer Körperfettanteil vor und nach der Behandlung sowie die Zunahme an prozentuaalem Körperfett (mean \pm S.E.) im *intravenösen* Durchgang

	Sibutramin	Placebo
vor der Behandlung	21,9 % \pm 2,8	25,1 % \pm 1,8
nach der Behandlung	27,7 % \pm 2,8	29,4 % \pm 0,6
Zunahme	5,8 \pm 0	4,3 \pm 1,1

Zur exakteren Bestimmung der Körperzusammensetzung wurde während des *intravenösen* Sibutramindurchgangs die Methode der Körperwasserbestimmung mittels Deuteriumoxid im Rahmen einer Bachelor-Arbeit von Fr. M. Goerke etabliert (Goerke, 2004). Die daraus errechneten Werte des Körperfettanteils vor und nach der Behandlung sind in Tab. 14 wiedergegeben. Dabei wird erkennbar dass die Placebotiere mit 25,1 % vor dem Beginn der Behandlung schon einen höheren Körperfettgehalt als die Sibutramintiere mit 21,9 % hatten. Erwartungsgemäß stieg der Körperfettgehalt bei einer Erhöhung der Lebendmasse von 100 auf 130 kg sowohl bei den Placebotieren als auch bei den Sibutramintieren an. Dabei kann der absolute Anstieg des Körperfettgehalts von absolut 5,8 % bei den Sibutramintieren im Vergleich zu den Placebotieren mit 4,3 % aufgrund der Genauigkeit des Messverfahrens als nahezu identisch angesehen werden. Offenbar hatte die Behandlung mit Sibutramin keinen nennenswerten Effekt auf den Körperfettgehalt. Jedoch lässt die geringe Tierzahl ($n = 2$) keine endgültige Aussage zu.

4.1.7 Messung von Parametern im peripheren Blutplasma

4.1.7.1 pGH

Die Auswertung der Wachstumshormonkonzentrationen unter Sibutramin *per os* Applikation ist in Tab. 15 zu sehen.

Tab. 15 LSmeans \pm SEM des 12h pGH Mittelwert, Basalwert, Maximalwert, Amplitude und Frequenz während der Sibutramin *per os* Studie

	Sibutramin <i>per os</i> (n=3)		Placebo <i>per os</i> (n=3)	
	10 mg/kg LM	20 mg/kg LM	10 mg/kg LM	20 mg/kg LM
Mittelwert (ng/ml)	1,3 \pm 0,3 ^a	1,5 \pm 0,3 ^a	1,6 \pm 0,3 ^a	1,6 \pm 0,3 ^a
Basalwert (ng/ml)	1,1 \pm 0,3 ^a	1,2 \pm 0,3 ^a	1,3 \pm 0,3 ^a	1,4 \pm 0,3 ^a
Maximalwert (ng/ml)	2,0 \pm 0,4 ^a	2,9 \pm 0,4 ^a	2,4 \pm 0,4 ^a	2,5 \pm 0,4 ^a
Amplitude (ng/ml)	0,9 \pm 0,3 ^a	1,7 \pm 0,3 ^a	1,1 \pm 0,3 ^a	1,1 \pm 0,3 ^a
Frequenz (1/12h)	1,8 \pm 0,2 ^a	1,8 \pm 0,2 ^a	1,0 ^a	1,0 ^a

LSmeans in einer Zeile, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$).

Der paarweise Vergleich (t-test) der LSmeans zwischen den Phasen innerhalb der Gruppen und zwischen den Gruppen innerhalb der Phasen, ergab weder signifikante Unterschiede des Mittel-, Basal- oder Maximalwerts noch der Höhe der Amplitude oder der Frequenz.

Allerdings war bei Erhöhung der Dosierung von 10 mg/kg auf 20 mg/kg LM innerhalb der Sibutramin *per os* Behandlungsgruppe, eine Steigerung des Mittel-, Basal- oder Maximalwerts und der Amplitude zu erkennen. Demgegenüber blieben die Werte im gleichen Zeitraum innerhalb der Placebogruppe annähernd konstant (siehe Tab. 15).

Die Auswertung der Wachstumshormonkonzentrationen unter Sibutramin *intravenös* Applikation ist in Tab. 16 zu sehen.

Tab. 16 LSmeans \pm SEM des 12h pGH Mittelwert, Basalwert, Maximalwert, Amplitude und Frequenz während der Sibutramin i.v. Studie.

	Sibutramin i.v. (n=2)			Placebo i.v. (n=2)		
	Kontrolle	10 mg/kg	20 mg/kg	Kontrolle	10 mg/kg	20 mg/kg
Mittelwert (ng/ml)	3,1 \pm 0,3 ^a	3,1 \pm 0,3 ^a	2,9 \pm 0,3 ^a	2,9 \pm 0,3 ^a	3,0 \pm 0,3 ^a	3,0 \pm 0,3 ^a
Basalwert (ng/ml)	2,6 \pm 0,3 ^a	2,5 \pm 0,3 ^a	2,2 \pm 0,3 ^a	2,3 \pm 0,3 ^a	2,5 \pm 0,3 ^a	2,2 \pm 0,3 ^a
Maximalwert (ng/ml)	4,8 \pm 1,6 ^a	4,4 \pm 1,6 ^a	6,2 \pm 1,6 ^a	5,1 \pm 1,6 ^a	6,2 \pm 1,6 ^a	7,7 \pm 1,6 ^a
Amplitude (ng/ml)	2,3 \pm 1,8 ^a	1,9 \pm 1,8 ^a	4,0 \pm 1,8 ^a	2,8 \pm 1,8 ^a	3,7 \pm 1,8 ^a	5,5 \pm 1,8 ^a
Frequenz (1/12h)	0,5 \pm 0,6 ^a	0,5 \pm 0,6 ^a	1,0 \pm 0,6 ^a	1,5 \pm 0,6 ^a	1,5 \pm 0,6 ^a	1,5 \pm 0,6 ^a

LSmeans in einer Zeile, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$).

Der paarweise Vergleich (t-test) der LSmeans zwischen den Phasen innerhalb der Gruppen und zwischen den Gruppen innerhalb der Phasen, ergab weder signifikante Unterschiede des Mittel-, Basal- oder Maximalwerts noch der Höhe der Amplitude oder der Frequenz.

Es konnte keine durch Sibutramin bedingte Veränderung der Konzentration von Wachstumshormon im Blutplasma festgestellt werden.

4.1.7.2 IGF-I

Die IGF-I Konzentrationen im Blutplasma wurden sowohl während des *per os* als auch während des *intravenösen* Durchgangs in den 8.00 Uhr Probe gemessen. Die Verlaufskurve über den Versuchszeitraum ist für *per os* in Abb. 22 und für *i.v.* in Abb. 23 dargestellt.

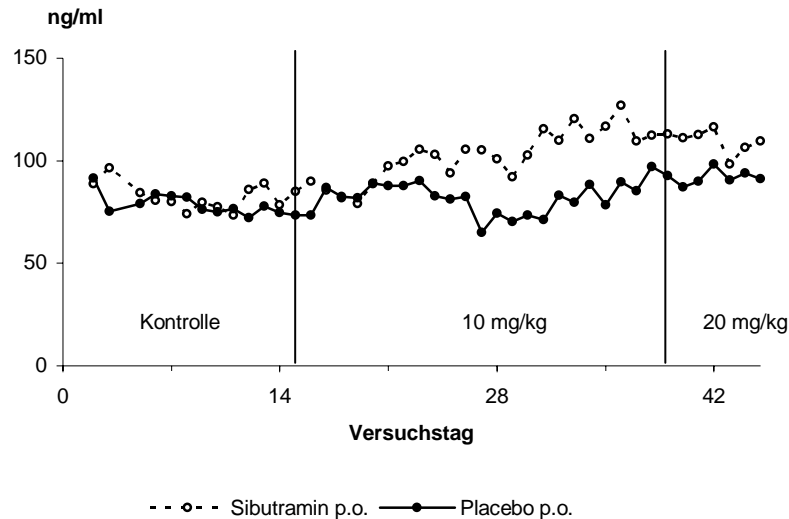


Abb. 22 IGF-I Verlaufskurve (mean) der mit Sibutramin *per os* behandelten Tiere (n = 3) und der mit einem Placebo behandelten Tiere (n = 3) in der Kontrollphase, der Phase der niedrigen Dosierung (10 mg/kg LM) und in der Phase der hohen Dosierung (20 mg/kg LM)

Die IGF-I Konzentration stieg kontinuierlich von 85 ng/ml zu Beginn der niedrigen Sibutramindosierung auf 112 ng/ml zum Ende dieser Phase an. In der Phase der hohen Dosierung konnte dann allerdings kein weiterer Anstieg mehr festgestellt werden (siehe Abb. 22).

Die Erhöhung der IGF-I Konzentrationen im Blutplasma wurde auch bei der varianzanalytischen Untersuchung der Phasenmittelwerte in Tab. 17 ersichtlich.

Tab. 17 LSmeans der mittleren IGF-1 Konzentrationen (ng/ml) bei *per os* Applikation von Sibutramin

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	82,2 ^a	79,2 ^a	ns
10 mg/kg LM	102,3 ^b	81,5 ^a	ns
20 mg/kg LM	109,6 ^b	92,0 ^a	ns

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 17,0.

Innerhalb der Sibutramingruppe erhöhten sich die IGF-I Konzentrationen sowohl durch die hohe als auch durch die niedrige *per os* Sibutraminapplikation signifikant im Vergleich zur Kontrollphase. Die Unterschiede, zu den im gleichen Zeitraum mit einem Placebo behandelten Tieren, die keine signifikante Erhöhung der IGF-I Konzentrationen im Blutplasma im Verlauf der Phasen aufwiesen, sind allerdings in keiner Phase signifikant.

Die IGF-I Verlaufskurve des *intravenösen* Sibutramindurchgangs ist in Abb. 23 dargestellt.

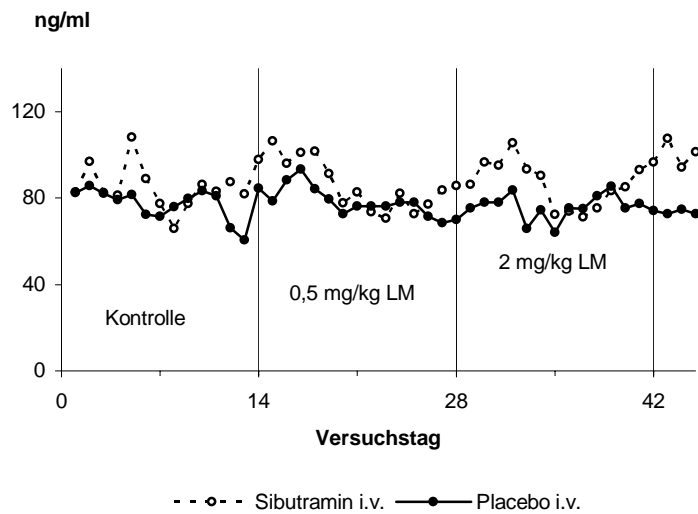


Abb. 23 IGF-I Verlaufskurve (mean) der mit Sibutramin *intravenös* behandelten Tiere (n = 2) und der mit einem Placebo behandelten Tiere (n = 2) in der Kontrollphase, der Phase der niedrigen Dosierung (0,5 mg/kg LM) und in der Phase der hohen Dosierung (2 mg/kg LM)

Die IGF-I Konzentrationen sind innerhalb der Sibutramingruppe auf einem etwas höheren Niveau als die der Placebotiere. Im Verlauf der niedrigen oder hohen Sibutramindosierung kann anhand der Verlaufskurve allerdings kein weiterer Anstieg von IGF-I festgestellt werden (siehe Abb. 23).

Die LSmeans der IGF-I Konzentrationen des intravenösen Sibutramindurchgangs sind in Tab. 18 dargestellt.

Tab. 18 LSmeans der mittleren IGF-1 Konzentrationen (ng/ml) bei intravenöser Applikation von Sibutramin

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	85,5 ^a	77,6 ^a	ns
0,5 mg/kg LM	85,8 ^a	78,5 ^a	ns
2 mg/kg LM	89,2 ^a	75,2 ^a	ns

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 8,5.

Während der hohen intravenösen Dosierung von Sibutramin konnte eine leichte Erhöhung der IGF-I Konzentrationen um 3,7 ng/ml festgestellt werden. Die IGF-I Konzentration war in der Phase der hohen Dosierung von Sibutramin allerdings weder von den anderen Phasen innerhalb der Sibutramingruppe noch zur Placebogruppe innerhalb derselben Phase signifikant verschieden.

4.1.7.3 Cortisol

Die Messung der Cortisolkonzentration im Blutplasma erfolgte in den täglichen 8.00 Uhr Proben. Die Proben des *per os* Sibutramin Durchgangs wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Fr. B. Huonker gemessen (Huonker, 2004).

Die LSmeans der Behandlungsphasen innerhalb der Gruppen während des Sibutramin *per os* Durchgangs sind in Tab. 19 und die des Sibutramin *i.v.* Durchgangs in Tab. 20 dargestellt.

Tab. 19 LSmeans der mittleren Cortisolkonzentration (ng/ml) in der Kontroll-, niedrigen- und hohen Dosierungsphase während des Sibutramin *per os* Durchgangs (n = 3)

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	18,4 ^a	21,6 ^a	ns
10 mg/kg LM	16,5 ^a	22,3 ^a	ns
20 mg/kg LM	16,9 ^a	26,6 ^a	ns

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 5,2.

Die Cortisolkonzentration im Blutplasma zeigte keine signifikante Veränderung weder zwischen den Phasen noch zwischen den Gruppen. Bei Betrachtung der Entwicklung der Einzeltierwerte fällt auf, dass keine einheitliche Tendenz der Entwicklung der Cortisolkonzentration festzustellen war. So stieg bei zwei Tieren innerhalb der Sibutramingruppe die Cortisolkonzentration leicht an während sie bei einem Tier sank. Innerhalb der Placebogruppe konnte ebenfalls bei zwei Tieren eine steigende Cortisolkonzentration festgestellt werden während bei einem Tier sinkende Werte gemessen wurden.

Die LSmeans des intravenösen Sibutramin Durchgangs sind in Tab. 20 dargestellt.

Tab. 20 LSmeans der mittleren Cortisolkonzentration (ng/ml) in der Kontroll-, niedrigen- und hohen Dosierungsphase während des Sibutramin i.v. Durchgangs (n = 2)

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	26,9 ^a	32,4 ^a	ns
0,5 mg/kg LM	31,7 ^a	37,3 ^a	ns
2 mg/kg LM	24,8 ^a	34,0 ^a	ns

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 3,6.

Wie bei der oralen Dosierung von Sibutramin, kann auch bei der intravenösen Dosierung keine einheitliche Entwicklung der Cortisolkonzentration festgestellt werden. Dementsprechend konnten auch keine signifikanten Veränderungen, weder zwischen den Behandlungsphasen noch zwischen den Gruppen festgestellt werden.

4.1.7.4 Aldosteron

Zur Überprüfung einer durch Sibutramin eventuell bedingten Beeinflussung von Aldosteron wurden die Konzentrationen in den täglichen 8.00 Uhr Plasmaproben der Sibutramin per os Gruppe gemessen. Die Konzentrationen der Sibutramingruppe und der Placebogruppe sind in Abb. 24 wiedergegeben.

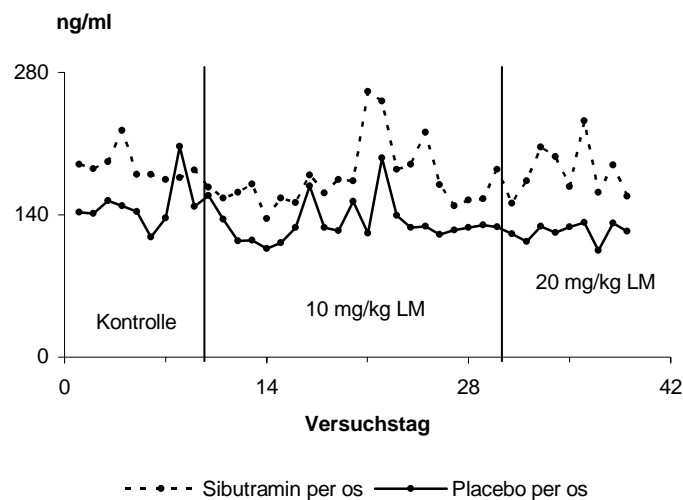


Abb. 24 Aldosteron Verlaufskurve während der Kontrollphase, der Phase der niedrigen Dosierung und der Phase der hohen Dosierung bei *per os* Applikation von Sibutramin (mean, n=3)

Der Verlauf der Aldosteronkonzentrationen im Blutplasma lies keine Veränderung über den Versuchszeitraum erkennen. Auffällig waren allerdings die Unterschiede des basalen Niveaus zwischen den Gruppen. Diese können auf tierindividuelle Niveauunterschiede der Aldosteronkonzentration zurückgeführt werden. Die durchgeführte Auswertung der LSmeans der Mittelwerte der Phasen ist in Tab. 21 dargestellt

Tab. 21 LSmeans der mittleren Aldosteronkonzentration (pg/ml) in der Kontroll-, niedrigen- und hohen Dosierungsphase während des Sibutramin *per os* Durchgangs (n = 3)

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	187 ^a	146 ^a	ns
10 mg/kg LM	209 ^a	131 ^a	*
20 mg/kg LM	187 ^a	125 ^a	ns

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 19

Zwischen den Phasen innerhalb der Sibutramingruppe konnte keine signifikante Veränderung der Werte festgestellt werden. Die Konzentration lag innerhalb der Sibutramingruppe in der Kontrollphase auf 187 pg/ml etwas niedriger als in der Phase der niedrigen Sibutramin Dosierung mit 209 pg/ml um dann in der Phase der hohen Dosierung wieder auf den Wert in der Kontrollphase abzufallen.

In der Placebogruppe war ein, auch in der Kontrollphase auftretendes, niedrigeres Niveau der Aldosteronkonzentration als in der Sibutramingruppe zu finden. Dieses niedrigere Niveau führte letztendlich auch zu dem signifikanten Unterschied zwischen der Sibutramin- und der Behandlungsgruppe in der Phase der niedrigen Dosierung. Dieser signifikante Unterschied ist daher auf tierindividuelle Niveauunterschiede und nicht auf eine durch Sibutramin bedingte Veränderung der Aldosteronkonzentration zurückzuführen.

4.1.7.5 Harnstoff

Die Harnstoffkonzentrationen im Blutplasma wurden in den täglichen 15.00 Uhr Proben gemessen. Der Verlauf der Harnstoffwerte während des Sibutramin *per os* Durchgangs ist in Abb. 25 und Abb. 26 wiedergegeben.

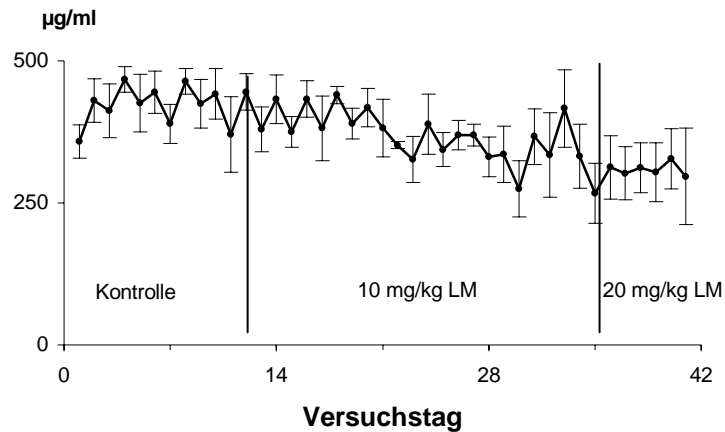


Abb. 25 Verlauf der Harnstoffkonzentration (mean \pm S.E.M) im Blutplasma der Sibutramingruppe während des Sibutramin *per os* Durchgangs in den 15.00 Uhr Proben

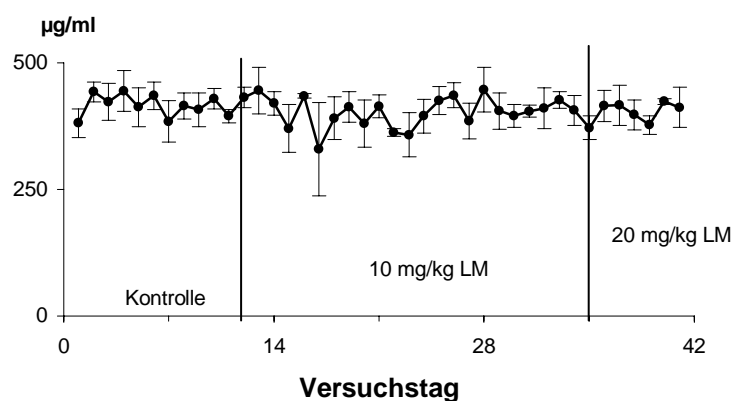


Abb. 26 Verlauf der Harnstoffkonzentration (mean \pm S.E.M) im Blutplasma der Placebogruppe während des Sibutramin *per os* Durchgangs in den 15.00 Uhr Proben

Die Harnstoffkonzentration im Blutplasma zeigte innerhalb der Sibutramingruppe ab Versuchstag 25, in der Phase der niedrigen Dosierung, eine abnehmende Tendenz im Vergleich zur Placebogruppe, die einen konstanten Verlauf zeigte. Die Reduktion der Harnstoffkonzentration ist auch noch während der Phase der hohen Dosierung erkenntlich, wobei hier das Erreichen eines verringerten Plateaus erkenntlich wird.

Die LSmeans der Harnstoffkonzentration im Blutplasma während des *per os* Sibutramin Durchgangs ist in Tab. 22 dargestellt.

Tab. 22 LSmeans der Harnstoffkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) im Blutplasma in der Kontroll-, niedrigen- und hohen Dosierungsphase während des Sibutramin *per os* Durchgangs (n = 3)

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	421 ^a	416 ^a	ns
10 mg/kg LM	375 ^b	404 ^a	ns
20 mg/kg LM	302 ^c	402 ^a	ns

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 33.

Die abnehmende Tendenz der Harnstoffkonzentration im Blutplasma spiegelte sich in einem signifikant sinkenden Mittelwert in der Phase der niedrigen Sibutramin Dosierung im Vergleich zur Kontrollphase wieder ($p = 0,014$). In der Phase der hohen Dosierung reduziert sich der Harnstoffgehalt weiter und ist sowohl von der Phase der niedrigen Dosierung ($p = 0,002$) als auch von der Kontrollphase ($p \leq 0,001$) signifikant reduziert. Die Werte der Placebo Gruppe bleiben hingegen konstant (siehe Tab. 22).

Die LSmeans der Harnstoffkonzentration im Blutplasma während des *intravenösen* Sibutramin Durchgangs ist in Tab. 23 dargestellt.

Tab. 23 LSmeans der Harnstoffkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) in der Kontroll-, niedrigen- und hohen Dosierungsphase während des *intravenösen* Sibutramin Durchgangs (n = 2)

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	303 ^a	370 ^a	ns
0,5 mg/kg LM	326 ^a	375 ^a	ns
2 mg/kg LM	333 ^a	360 ^a	ns

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 46.

Die Harnstoffkonzentration im Blutplasma ist während des *intravenösen* Sibutramin Durchgangs weder zwischen den Phasen innerhalb der Gruppen noch zwischen den Gruppen innerhalb der Phasen signifikant unterschieden. Eine Veränderung während des Versuchszeitraums konnte somit nicht festgestellt werden.

4.1.7.6 Glucose

Zur Überprüfung der Glucosekonzentration im Blutplasma wurden die täglichen 8.00 Uhr Proben in zweitägigem Abstand während des kompletten Versuchszeitraums gemessen. Die Ergebnisse während des Sibutramin *per os* Durchgangs sind in Tab. 24 und die des *intravenösen* Sibutramin Durchgangs in Tab. 25 dargestellt.

Tab. 24 LSmeans der Glucosekonzentration ($\mu\text{g/ml}$) in der Kontroll-, niedrigen- und hohen Dosierungsphase während des Sibutramin *per os* Durchgangs (n = 3)

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	553,3 ^a	572,1 ^a	ns
10 mg/kg LM	553,9 ^a	536,7 ^b	ns
20 mg/kg LM	562,6 ^a	546,0 ^{ab}	ns

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 17,9.

Die Glucosekonzentration im Blutplasma während des Sibutramin *per os* Durchgangs ist weder zwischen den Phasen noch zwischen den Gruppen innerhalb der Phase signifikant verschieden. Eine signifikante Verringerung der Glucosekonzentrationen wurde von der Kontroll- auf die niedrige Dosierungsphase innerhalb der Placebogruppe analysiert. Diese Verringerung setzt sich allerdings in der Phase der hohen Dosierung innerhalb der Placebogruppe nicht mehr fort. Die Glucosekonzentration im Blutplasma sind in dieser Phase nicht signifikant von den übrigen Phasen unterschieden (siehe Tab. 24).

Tab. 25 LSmeans der Glucosekonzentration ($\mu\text{g/ml}$) im Blutplasma in der Kontroll-, niedrigen- und hohen Dosierungsphase während des Sibutramin i.v. Durchgangs (n = 2)

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	810,3 ^a	863,7 ^a	ns
0,5 mg/kg LM	803,0 ^a	871,6 ^a	ns
2 mg/kg LM	763,7 ^a	810,0 ^a	ns

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 83,6.

Während des *intravenösen* Sibutramin Durchgangs konnte keine signifikante Veränderung der Glucosekonzentrationen, weder zwischen den Phasen noch zwischen den Gruppen innerhalb der Phasen, festgestellt werden. Allerdings war tendenziell eine, wenn auch nicht signifikante Verringerung der Glucosekonzentrationen zwischen den Phasen innerhalb der Sibutramin-Gruppe von der Kontroll- zur Phase der hohen Dosierung erkennbar (siehe Tab. 25).

4.1.7.7 Schilddrüsenhormone T3 und T4

Die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone T3 und T4 wurden von Dr. L. Thomas, Boehringer Ingelheim GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt.

Die Messung der Schilddrüsenhormone T3 und T4 erfolgte während der Kontrollphase in Blutplasmaproben von drei Tagen, in der niedrigen Dosierungsphase von sechs Tagen und in der hohen Dosierungsphase von drei Tagen. Von diesen Messergebnissen wurden die Mittelwerte gebildet und diese varianzanalytisch untersucht. Die Ergebnisse der Sibutramin *per os* Studie sind für T3 in Tab. 26 und für T4 in Tab. 27 wiedergegeben. Eine Auswertung des intravenösen Sibutramin Durchgangs fand aufgrund fehlender Messwerte nicht statt.

Tab. 26 LSmeans der mittleren T3 Konzentrationen (nmol/l) bei *per os* Applikation von Sibutramin

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	0,673 ^a	0,670 ^a	ns
10 mg/kg LM	0,823 ^b	0,770 ^b	ns
20 mg/kg LM	0,863 ^b	0,837 ^b	ns

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 0,060.

Die T3 Konzentrationen im Blutplasma während des Sibutramin *per os* Durchgangs zeigten sowohl innerhalb der Sibutramin- als auch der Placebogruppe einen signifikanten Anstieg von der Kontroll- auf die Phasen der Sibutramin Dosierung. Der etwas größere Anstieg bei den mit Sibutramin behandelten Tieren im Vergleich zu den Placebotieren führte jedoch nicht zu signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen innerhalb der Phasen. Bei der Bewertung des signifikanten Anstiegs der T3 Konzentration im Blutplasma muss die sinkende Temperatur während des Versuchszeitraums beachtet werden (siehe Abb. 27).

Tab. 27 LSmeans der mittleren T4 Konzentrationen (nmol/l) bei per os Applikation von Sibutramin

Phase	Sibutramin	Placebo	Signifikanz (vs. Gruppen)
Kontrolle	41,9, ^a	44,1 ^a	ns
10 mg/kg LM	45,7 ^a	46,7 ^a	ns
20 mg/kg LM	45,6 ^a	48,9 ^a	ns

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \leq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 6,6.

Bei den T4 Konzentrationen im Blutplasma konnte im Gegensatz zu T3 keine Phasenbedingte, signifikante Erhöhung festgestellt werden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen innerhalb der Phasen lagen ebenfalls unter dem Signifikanzniveau. Tendenziell war allerdings, analog zu T3, eine Erhöhung von T4 von der Kontroll- auf die Phasen der Dosierung festzustellen. Wie auch bei der T3 Konzentration muss bei der Bewertung des signifikanten Anstiegs der T4 Konzentration im Blutplasma die sinkende Temperatur während des Versuchszeitraums beachtet werden (siehe Abb. 27).

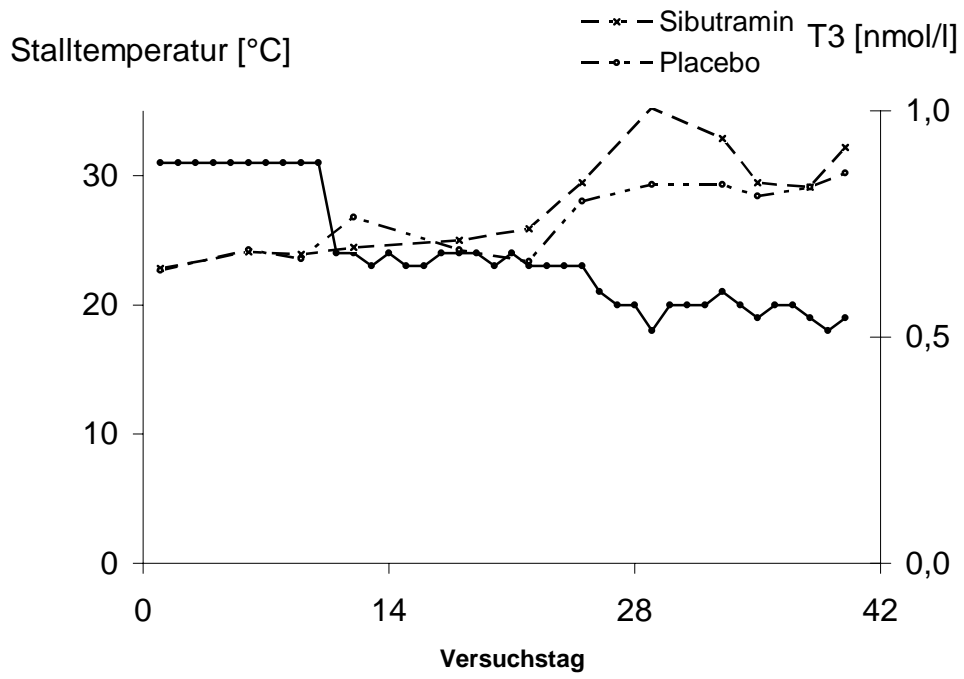


Abb. 27 9:00 Uhr Temperaturkurve im Stallgebäude während des Sibutramin per os Durchgangs

4.2 Versuchsteil „MCH-R1 Antagonist Compound B4“

4.2.1 Konzentration des MCH-R1 Antagonisten Compound B4 im Blutplasma

Die Ermittlung der Compound B4 Konzentration im Blutplasma fand in einem Zeitfenster 12 Stunden nach Verabreichung statt. Dabei wurden die Konzentrationen nach einer niedrigen Dosierung am 13.10.04 und nach der Verabreichung einer hohen Dosierung am 26.10.04 gemessen. Die AUD (area under the dose), AUC (area under the curve) und C_{\max} des MCH-R1 Antagonisten Compound B4 zeigten dosisabhängige Konzentrationen. Die AUD ist bei einer Erhöhung der Dosierung von 10 mg/kg LM auf 20 mg/kg LM etwa doppelt so hoch. Die AUC verdreifacht sich bei einer Verdopplung der Dosierung. Bei der maximalen Konzentration (C_{\max}) konnte ebenfalls eine Verdreifachung festgestellt werden (siehe Tab. 28)

Tab. 28 AUD, AUC und Cmax Werte des MCH-1R Antagonisten Compound B4 während der Phase der niedrigen Dosierung (10 mg/kg LM) und der Phase der hohen Dosierung (20 mg/kg LM)

	AUD 0-12h [ng x h x ml ⁻¹]	AUC 0-inf [ng x h x ml ⁻¹]	C_{\max} [ng/ml]
10 mg/kg LM (n=5) 12h window 13.10.04	425 ± 148	592 ± 262	55 ± 17
20 mg/kg LM (n=6) 12h window 26.10.04	1097 ± 379	1821 ± 713	153 ± 71

Die in Abb. 28 dargestellten Verlaufskurven zeigen die Compound B4 Konzentrationen im Blutplasma über einen 12stündigen Zeitraum nach der *per os* Applikation. Gestrichelt dargestellt ist der Verlauf nach der niedrigen Dosierung (10mg/kg LM), durchgezogen nach der hohen Dosierung (20 mg/kg LM). Aufgrund der Verlaufskurve kann eine deutliche dosisabhängige Compound B4 Konzentration im Blutplasma nachgewiesen werden.

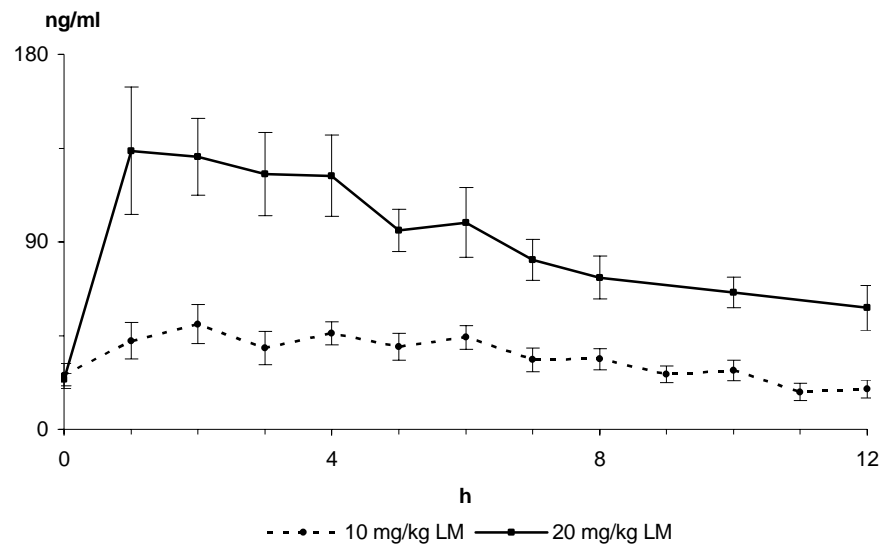


Abb. 28 Verlaufskurve (mean \pm SEM) der Compound B4 Konzentration nach *per os* Applikation von 10 mg/kg LM (n = 5) und 20 mg/kg LM (n = 6). Applikation erfolgte zum Zeitpunkt 0.

4.2.2 Futteraufnahme

Zur Erfassung der täglichen ad libitum Futteraufnahme wurde das nicht gefressene Futter zweimal täglich vor der nächsten Fütterung gewogen. Der Verlauf der täglichen Futteraufnahme über den Versuchszeitraum ist in Abb. 29 dargestellt.

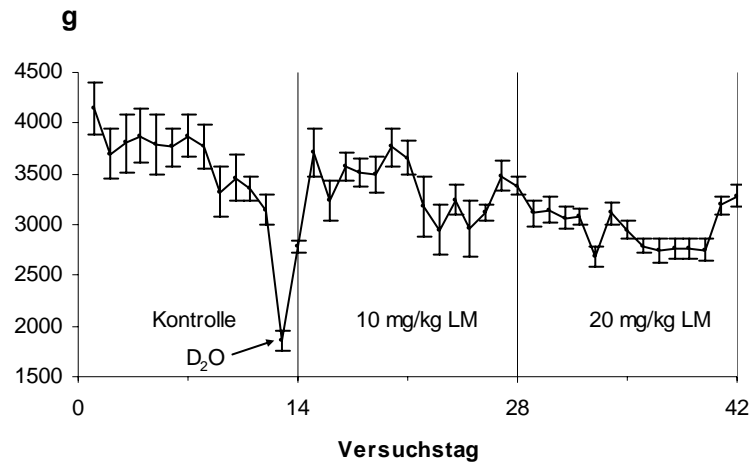


Abb. 29 Verlauf der täglichen Futteraufnahme (mean \pm S.E.M.) während des gesamten Versuchszeitraum mit einer Kontrollphase, einer niedrigen und einer hohen Dosierungsphase (n = 7)

Während des Versuchszeitraums war tendenziell eine abnehmende tägliche Futteraufnahme zu erkennen. Die sehr niedrige Futteraufnahme von 1851 g an Tag 13 ist auf die Futterrestriktion ab 15.00 Uhr, aufgrund der methodischen Anforderungen der D₂O Körperfettmessung zurückzuführen. Die Futteraufnahme an Tag 13 und an den drei darauf folgenden Tagen wurde bei der Berechnung des Mittelwerts der Phasen deshalb nicht berücksichtigt.

Die Auswertung der LSmeans der mittleren täglichen Futtermittelaufnahme innerhalb der Versuchsphasen zeigt Tab. 29.

Tab. 29 LSmeans der mittleren täglichen Futtermittelaufnahme (g) innerhalb der Kontrollphase, der Phase der niedrigen (10 mg/kg LM) und der hohen Dosierung (20 mg/kg LM)

Phase	mittlere tägliche Futtermittelaufnahme (g)
Kontrolle	3660 ^a
10 mg/kg LM	3332 ^b
20 mg/kg LM	2894 ^c

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \geq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 149.

Die mittlere tägliche Futtermittelaufnahme war von der von der Kontrollphase, mit 3660 g/d, zur Phase der niedrigen Dosierung, mit 3332 g/d, signifikant reduziert ($p = 0,027$).

Bei Verdopplung der Compound B4 Applikation von 10 mg/kg LM auf 20 mg/kg LM reduzierte sich die Futtermittelaufnahme weiter auf 2894 g/d und war damit signifikant von der Phase der niedrigen Dosierung ($p = 0,004$) und von der Kontrollphase ($p = 0,002$) unterschieden. Dabei ist bei allen sieben Tieren der Studie eine Verringerung der täglichen Futtermittelaufnahme von der Kontrollphase zur Phase der niedrigen Dosierung und zur Phase der hohen Dosierung zu beobachten.

4.2.3 Gewichtsentwicklung

Zur Erfassung der Gewichtsentwicklung wurden die Tiere zweimal wöchentlich, vor dem Füttern gewogen. Der Verlauf der Lebendmasseentwicklung während des Versuchszeitraums ist in Abb. 30 zu sehen.

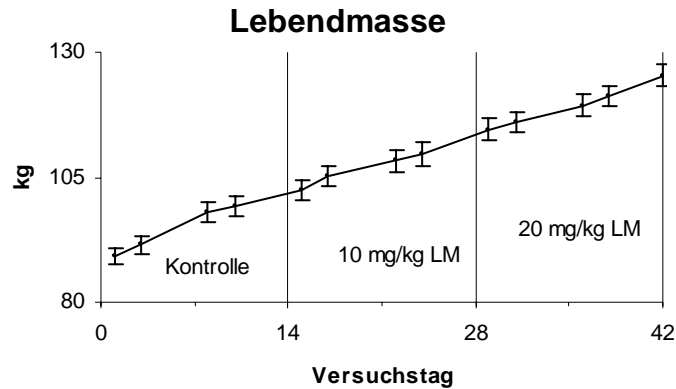


Abb. 30 Verlauf der Gewichtsentwicklung (mean \pm S.E.M.) während des Compound B4 Versuchs (n = 7).

Aufgrund der Verlaufskurve der Lebendmasseentwicklung konnte keine unmittelbare Beeinflussung der Zunahmen durch Compound B4 abgeleitet werden. Die weitere Auswertung der Gewichtsentwicklung erfolgte durch Berechnung der LSmeans des Mittelwerts der täglichen Zunahmen innerhalb der Versuchsphasen. Die Ergebnisse sind in Tab. 30 dargestellt.

Tab. 30 LSmeans der mittleren täglichen Zunahmen (g) innerhalb der Kontrollphase, der Phase der niedrigen (10 mg/kg LM) und der hohen Dosierung (20 mg/kg LM)

Phase	mittlere tägl. Zunahme (g)
Kontrolle	931 ^a
10 mg/kg LM	867 ^a
20 mg/kg LM	826 ^a

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \geq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 53.

Die LSmeans der mittleren täglichen Zunahmen innerhalb der Phasen zeigten von der Kontrollphase mit 931 g/d zur Phase der niedrigen Dosierung mit 867 g/d eine abnehmende Tendenz. Eine weitere Abnahme der täglichen Zunahme in gleicher Größenordnung war von der Phase der niedrigen Dosierung zur Phase der hohen Dosierung mit 826 g/d zu erkennen. Dabei ist zu beachten, dass bei fünf Tieren eine Verringerung der täglichen Zunahme von der Kontrollphase auf die Phase der hohen Dosierung festzustellen war, bei zwei Tieren sich die tägliche Zunahme jedoch im gleichen Zeitraum erhöht. Letztendlich kann deshalb keine signifikante Verringerung der täglichen Zunahme festgestellt werden.

4.2.4 Futtermittelverwertung

Die Futtermittelverwertung wurde in Gramm Futter pro Kilogramm Zunahme berechnet. Die LSmeans der mittleren Futtermittelverwertung ist in Tab. 31 wiedergegeben.

Tab.31 LSmeans der mittleren Futtermittelverwertung (g Futteraufnahme pro kg Zunahme) innerhalb der Kontrollphase, der Phase der niedrigen (10 mg/kg LM) und der hohen Dosierung (20 mg/kg LM)

Phase	Futtermittelverwertung (g Futter pro kg Zunahme)
Kontrolle	3988 ^a
10 mg/kg LM	3908 ^a
20 mg/kg LM	3553 ^a

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \geq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 220.

Der nicht signifikante Unterschied zwischen der Kontrollphase und der Phase der hohen Dosierung ($p = 0,062$) erklärt sich durch die sehr heterogene Entwicklung der Mittelwerte der Phasen innerhalb der Einzeltiere. So kann von der Kontrollphase zur Phase der hohen Dosierung bei fünf Tieren eine Verringerung der Futtermittelverwertung festgestellt werden, wohingegen bei zwei Tieren eine Erhöhung zu beobachten ist. Aufgrund des nicht einheitlichen Einflusses der Behandlungsphasen auf die Futtermittelverwertung ist kein Effekt von Compound B4 auf die Futtermittelverwertung zu erkennen.

4.2.5 Wasserverbrauch

Die Erfassung des 24stündigen Wasserverbrauchs fand präprandial um 7.30 Uhr statt. Der Verlauf des Mittelwerts über den gesamten Versuchszeitraum ist in Abb. 31 dargestellt.

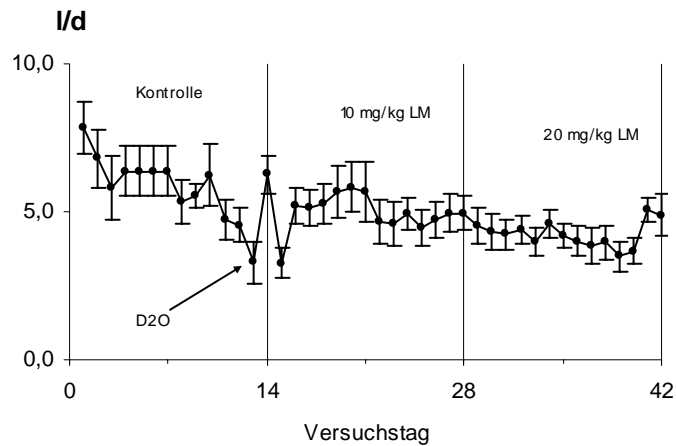


Abb. 31 Verlauf der täglichen Wasseraufnahme (mean \pm S.E.M.) während der Compound B4 Studie in der Kontrollphase, der niedrigen- und hohen Dosierungsphase (n = 7).

Der Verlauf zeigte tendenziell eine sinkende tägliche Wasseraufnahme der Tiere über den Versuchszeitraum. Die niedrige Wasseraufnahme an Tag 13 ist auf die sechsstündige Wasserrestriktion aufgrund der D₂O Bestimmung des Körperwassers zurückzuführen. Der Wert an Tag 13 und an den drei darauf folgenden Tagen wurde bei der Berechnung der Mittelwerte der Phasen aus diesem Grund nicht berücksichtigt. Die Auswertung der LSmeans ist in Tab. 32 zu sehen.

Tab. 32 LSmeans der mittleren täglichen Wasseraufnahme (l/d) innerhalb der Kontrollphase, der Phase der niedrigen (10 mg/kg LM) und der hohen Dosierung (20 mg/kg LM)

Phase	mittlere tägliche Wasseraufnahme (l/d)
Kontrolle	5,9 ^a
10 mg/kg LM	5,1 ^b
20 mg/kg LM	4,1 ^c

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \geq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 0,6.

Die Wasseraufnahme der Tiere reduzierte sich von der Kontrollphase zur Phase der niedrigen Dosierung signifikant ($p = 0,013$). Im weiteren Versuchsverlauf verringerte sie sich weiter, so dass die Tiere in der Phase der hohen Dosierung im Vergleich zur Phase der niedrigen Dosierung ($p = 0,006$) und zur Kontrollphase ($p = 0,001$) eine signifikant reduzierte Wasseraufnahme hatten.

4.2.6 Körperfettgehalt

Die Berechnung des Körperfettgehalts mittels des mit Hilfe von D₂O bestimmten Körperwassers wurde sowohl am Ende der Kontrollphase als auch am Ende der Phase der hohen Dosierung durchgeführt. Die Auswertung fand mittels t-Test bei gepaarten Stichproben für den Körperfettgehalt in Prozent und für den Körperfettgehalt in kg statt. Die Mittelwerte sind in Tab. 33 wiedergegeben.

Tab. 33 Körperfettgehalt in Prozent und in Kilogramm vor und nach der 28tägigen Verabreichung von Compound B4 (mean ± S.D.).

		Körperfett (%)	Körperfett (kg)
Start	Dosierung	25,0 ^a	24,4 ^a
(03.10.04)		±3,1	±3,8
Ende	Dosierung	32,3 ^b	39,3 ^b
(02.11.04)		±3,8	±6,1

Während der 28tägigen Compound B4 Applikation konnte ein Anstieg des Körperfettgehalts festgestellt werden. Der Vergleich der Entwicklung des Körperfettgehalts mit den Werten der Placebogruppe aus dem ersten Teil des Versuchs (siehe Tab. 34) zeigte bei beiden Gruppen einen identischen mittleren prozentualen Körperfettgehalt zu Beginn der Behandlungen. Am Ende des Versuchszeitraums konnte bei der Placebogruppe im Vergleich zur Compound B4 Gruppe dann ein deutlich niedrigerer Körperfettgehalt festgestellt werden. Hierbei muss allerdings einschränkend beachtet werden, dass sich die Placebogruppe aus lediglich zwei Tieren zusammensetzt.

Tab. 34 Körperfettgehalt in Prozent und in Kilogramm vor und nach der 30tägigen Verabreichung eines Vehikels (Placebo; n = 2). Werte stammen aus dem ersten Versuchsteil (mean ± S.D.).

		Körperfett (%)	Körperfett (kg)
Start	Dosierung	25,1 ^a	25,1 ^a
(12.02.04)		±1,8	±1,6
Ende	Dosierung	29,5 ^b	37,2 ^b
(12.03.04)		±0,6	±0,2

4.2.7 Messung von Parametern im peripheren Blutplasma

4.2.7.1 pGH

Da pGH ein pulsatile Freisetzungsmuster aufweist, erfolgte die radioimmunologische Messung in den Proben der „12h Windows“ jeder Versuchsphase. Das pulsatile Freisetzungsmuster von pGH wurde über verschiedene Kriterien charakterisiert. Der Mittelwert aller Proben des „12h Windows“ spiegelt dabei das Niveau der Konzentration wieder. Ein Puls wurde als Überschreitung des Mittelwerts um die doppelte Standardabweichung und anschließendem Abfall über mindestens zwei Werte definiert. Der Basalwert wurde aus den acht niedrigsten Werten der Window Proben berechnet. Der Maximalwert ergab sich aus dem Mittelwert der Pulse. Die Differenz zwischen Maximal- und Basalwert lieferte die Amplitude. Die Pulsfrequenz bezieht sich auf die gesamte Dauer des Windows (Pulse/12 Stunden). Die Auswertung der LSmeans der oben angesprochenen Kriterien ist in Tab. 35 zu sehen.

Tab. 35 LSmeans des 12h pGH (ng/ml) Mittelwert, Basalwert, Maximalwert, Amplitude und Frequenz während der Compound B4 per os Studie.

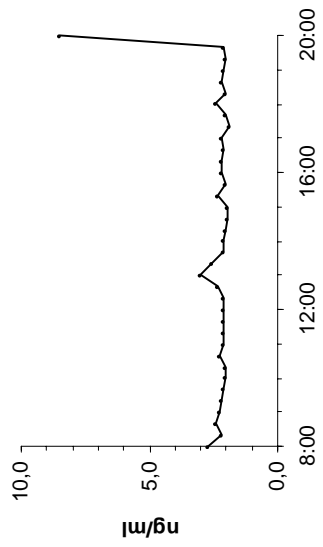
	Compound B4 per os (n = 7)		
	Kontrolle	10 mg/kg	20 mg/kg
Mittelwert (ng/ml)	2,6 ±0,2 ^a	2,4 ±0,2 ^a	2,4 ±0,2 ^a
Basalwert (ng/ml)	1,9 ±0,2 ^a	2,0 ±0,2 ^a	2,0 ±0,2 ^a
Maximalwert (ng/ml)	5,0 ±0,8 ^a	7,4 ±0,9 ^b	4,9 ±0,8 ^a
Amplitude (ng/ml)	3,2 ±0,8 ^a	5,5 ±0,9 ^a	2,8 ±0,8 ^a
Frequenz (1/12h)	1	1	1

LSmeans in einer Zeile, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \geq 0,05$).

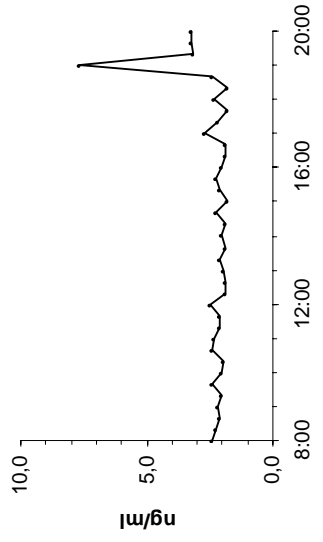
Bei Betrachtung der pGH Verlaufskurven in Abb. 32 und Abb. 33 und bei der Auswertung der LSmeans konnten keine signifikanten Veränderungen der angesprochenen pGH Kriterien zwischen den Versuchsphasen festgestellt werden.

pGH ng/ml

Kontrolle



10 mg/kg LM



20 mg/kg LM

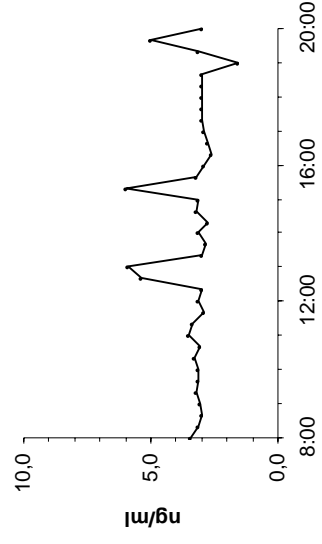
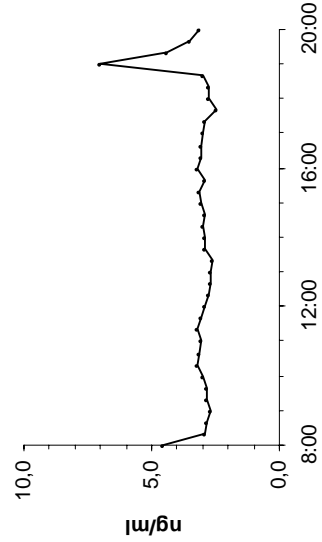
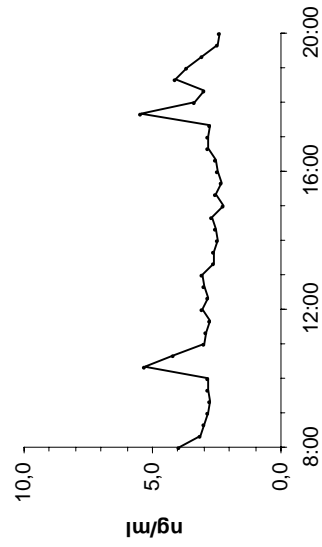
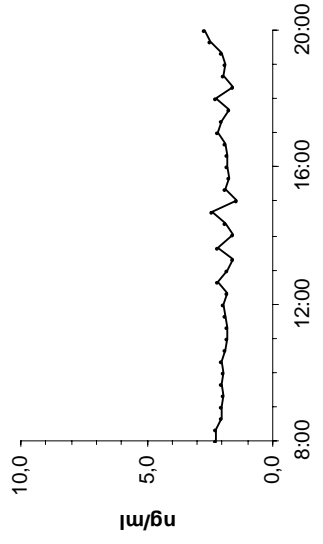
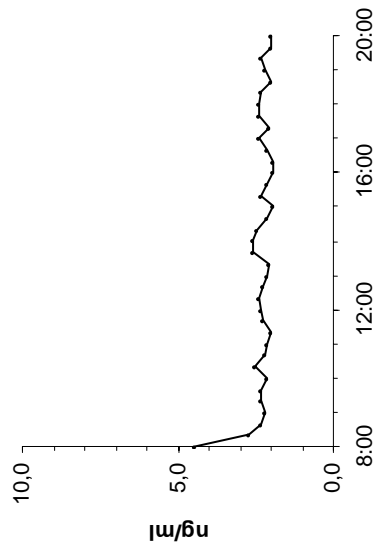


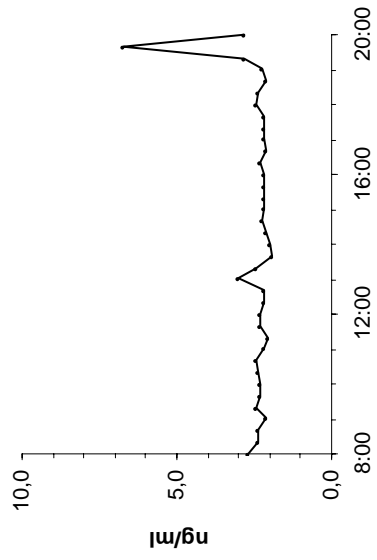
Abb. 32 Beispielhafter Verlauf der pGH Konzentration der Tiere Suppi und Seppi in einem 12stündigen Zeitfenster während der Kontroll-, der Phase der niedrigen und der Phase der hohen Dosierung von Compound B4

pGH (ng/ml)

Kontrolle



10 mg/kg LM



20 mg/kg LM

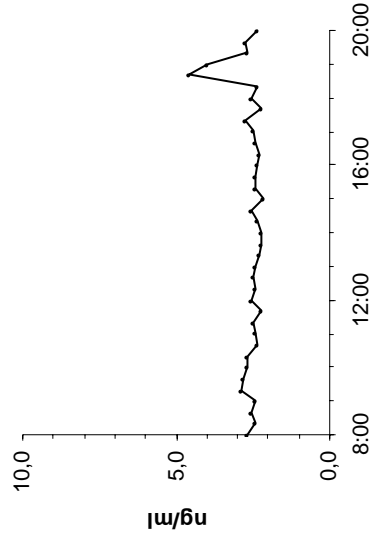
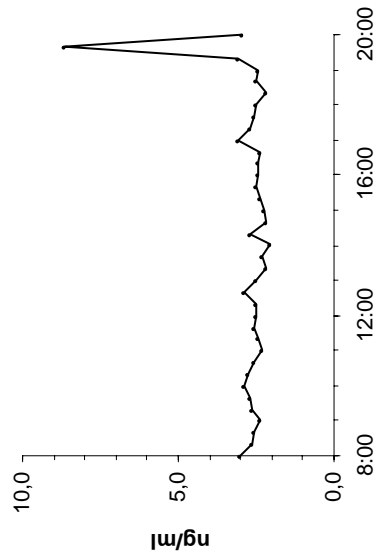
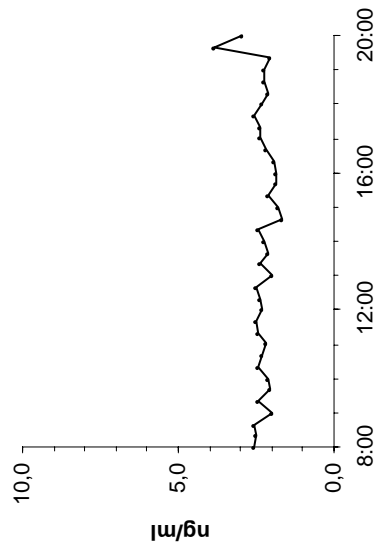
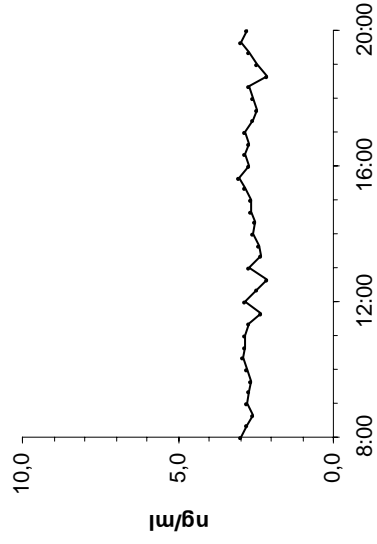


Abb. 33 Beispielhafter Verlauf der pGH Konzentration von Stefan und Sieger in einem 12stündigen Zeitfenster während der Kontroll-, der Phase der niedrigen und der Phase der hohen Dosierung von Compound B4

4.2.7.2 IGF-I

Die IGF-I Konzentrationen wurden in den 8.00 Uhr Proben gemessen. Der Verlauf über den Versuchszeitraum ist in Abb. 34 zu sehen.

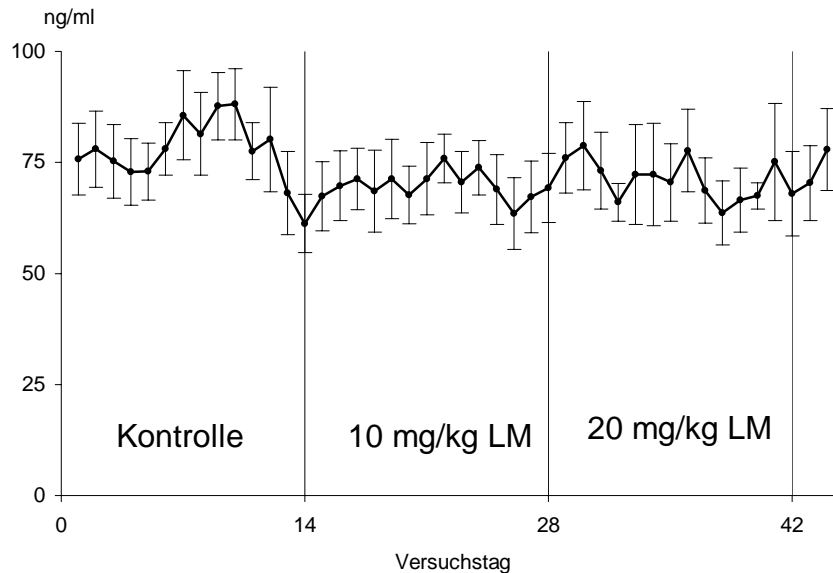


Abb. 34 IGF-I (mean \pm S.E.M.) Verlaufskurve bei per os Applikation von Compound B4 während der Kontroll-, der niedrigen und der Phase der hohen Dosierung (n = 7).

Die IGF-I Verlaufskurve zeigte an Tag 13 und 14, dem Tag der Futter- und Wasserrestriktion, eine Verringerung der Konzentration. Aus diesem Grund wurden die Werte der Tage 13 + 3 bei der Berechnung der Mittelwerte der Phasen nicht berücksichtigt. Nach dem Beginn der Compound B4 Verabreichung, konnte eine Verringerung der IGF-I Konzentration festgestellt werden. Diese zeigt bei der Betrachtung der Verlaufskurve allerdings keine weitere dosisabhängige Reduktion bei einer Verdopplung der Dosierung von 10 mg/kg LM in der Phase der niedrigen Dosierung auf 20 mg/kg LM in der Phase der hohen Dosierung.

Die Auswertung der LSmeans der Mittelwerte der Phasen ist in Tab. 36 dargestellt.

Tab. 36 LSmeans der mittleren IGF-1 Konzentrationen (ng/ml) bei per os Applikation von Compound B4.

Phase	IGF-I (ng/ml)
Kontrolle	79,4 ^a
10 mg/kg LM	67,9 ^b
20 mg/kg LM	72,1 ^b

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \geq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 7,0.

Die Auswertung der LSmeans zeigt eine signifikante Reduktion der IGF-I Konzentration von der Kontrollphase mit 79,4 ng/ml auf die Phase der niedrigen Dosierung mit 67,4 ng/ml ($p = 0,001$) und die Phase der hohen Dosierung mit 72,1 ng/ml ($p = 0,014$). Die Konzentrationen zwischen der niedrigen und hohen Dosierung von Compound B4 unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Bei Betrachtung der Einzeltiermittelwerte kann bei sechs Tieren eine Reduktion der IGF-I Mittelwerte bei Behandlung mit Compound B4 festgestellt werden. Bei einem Tier wurde in der gleichen Zeit eine geringfügige Erhöhung, von 66,0 ng/ml in der Kontrollphase auf 67,3 ng/ml in der Phase der hohen Dosierung, ermittelt.

4.2.7.3 Cortisol

Die Cortisolkonzentration wurde in den täglichen 8.00 Uhr Proben gemessen. Der Verlauf des Mittelwerts während des gesamten Versuchszeitraums ist in Abb. 35 dargestellt.

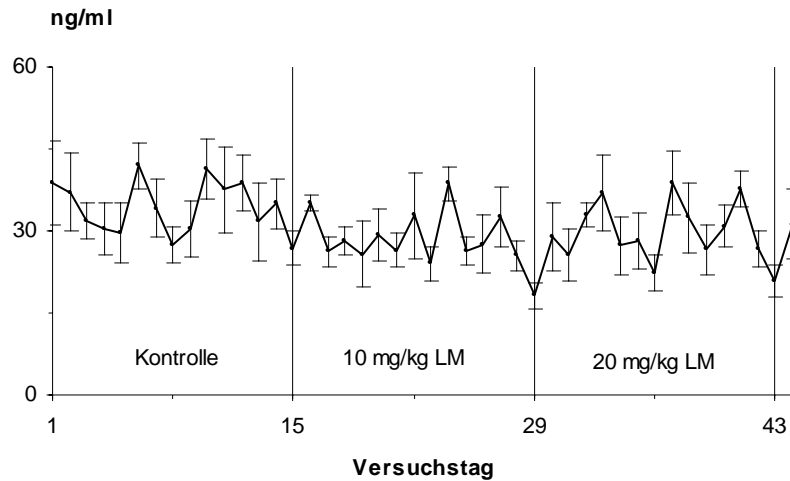


Abb. 35 Cortisol Verlaufskurve über den Versuchszeitraum mit einer Kontrollphase, einer Phase der niedrigen und einer Phase der hohen Dosierung von Compound B4 (mean \pm S.E.M.; n = 7)

Die Betrachtung des Cortisolprofils über den Versuchszeitraum zeigte tendenziell einen abnehmenden Verlauf. Dieser Eindruck bestätigte sich durch die Auswertung der LSmeans der Mittelwerte der Phasen in Tab. 37.

Tab. 37 LSmeans der mittleren Cortisolkonzentration (ng/ml) in der Kontroll-, niedrigen- und hohen Dosierungsphase während des Compound B4 per os Durchgangs (n = 7)

Phase	Cortisol (ng/ml)
Kontrolle	34,7 ^a
10 mg/kg LM	29,3 ^{ab}
20 mg/kg LM	29,2 ^b

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \geq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 3,2

Bei der Auswertung der LSmeans konnte eine signifikante Reduktion der Cortisolkonzentration von 34,7 ng/ml in der Kontrollphase auf 29,2 ng/ml in der Phase der hohen Dosierung analysiert werden ($p = 0,027$). Dabei war in der Phase der niedrigen Dosierung kein signifikanter Unterschied zur Kontrollphase ($p = 0,18$) und zur Phase der hohen Dosierung ($p = 0,988$) zu erkennen. Allerdings waren die LSmeans beider Behandlungsphasen geringer als die der Kontrollphase. Insgesamt sind bei sechs von sieben Tieren die Cortisolwerte während der Compound B4 Verabreichung reduziert. Ein Tier weist unter Compound B4 Behandlung eine höhere Cortisolkonzentration auf.

4.2.7.4 Aldosteron

Zur Überprüfung einer eventuellen Wirkung von Compound B4 auf Aldosteron wurden die 8.00 Uhr Proben in zweitägigem Abstand in jeder Versuchsphase gemessen. Auf eine Messung der Konzentrationen während der Futter- und Wasserrestriktion um Tag 13 \pm 2 wurde aufgrund der Erfahrungen mit IGF-I und Harnstoff verzichtet. Die LSmeans der Mittelwerte der Phasen sind in Tab. 38 dargestellt.

Tab. 38 LSmeans der mittleren Aldosteron Konzentration (pg/ml) in der Kontrollphase, der niedrigen- und hohen Dosierungsphase während des Compound B4 per os Durchgangs (n = 7)

Phase	Aldosteron (pg/ml)
Kontrolle	120 ^a
10 mg/kg LM	112 ^a
20 mg/kg LM	115 ^a

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \geq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 13

Die Auswertung der LSmeans der Mittelwerte der Aldosteronkonzentration innerhalb der Phasen erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Phasen. Dazu passend ergab sich bei der Betrachtung der Phasenmittelwerte der Einzeltiere kein einheitliches Bild, das auf eine Wirkung von Compound B4 auf die Aldosteronwerte schließen lässt.

4.2.7.5 Harnstoff

Die Harnstoffkonzentration wurde in den tägl. 15.00 Uhr Proben gemessen. Der Verlauf über den Versuchszeitraum ist in Abb. 36 zu sehen.

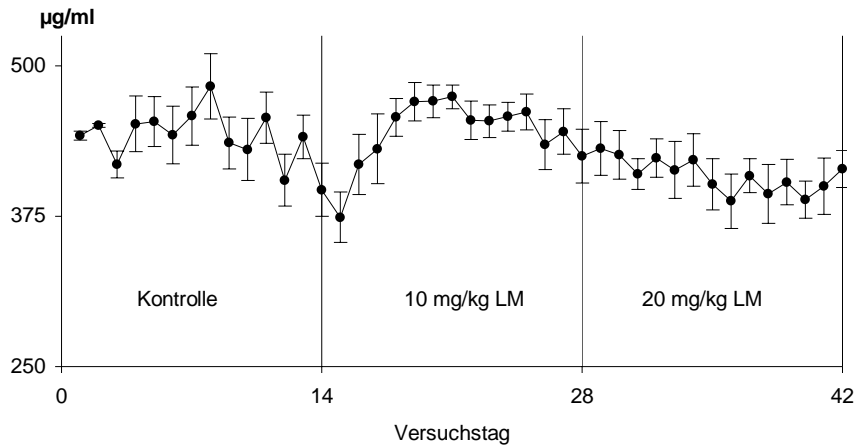


Abb. 36 Verlauf der Harnstoffkonzentration (mean \pm S.E.M.) in den 15.00 Uhr Proben während der Compound B4 per os Studie (n = 7)

Während der Kontrollphase zeigte sich ein Einbruch der Harnstoffkonzentration zu Beginn der Phase der niedrigen Dosierung. Dieser Einbruch fiel auf den Zeitpunkt der D₂O Probenahme und der damit verbundenen zwölfstündigen Nüchterung der Tiere. Die Harnstoffwerte an Tag 13 und den drei darauf folgenden Tagen wurde deshalb nicht in die Berechnung der Mittelwerte der Phasen mit einbezogen. Anschließend kam es zu einem raschen Wideranstieg auf das Niveau der Kontrollphase, gefolgt von einem kontinuierlichen Abfall bis zum Ende des Versuchszeitraums.

Die paarweisen Vergleiche der LSmeans der Mittelwerte der Versuchsphasen sind in Tab. 39 dargestellt.

Tab. 39 LSmeans der mittleren Harnstoffkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) in der Kontrollphase, der niedrigen- und hohen Dosierungsphase während des Compound B4 per os Durchgangs (n = 7)

Phase	Harnstoff ($\mu\text{g/ml}$)
Kontrolle	447 ^a
10 mg/kg LM	446 ^{ab}
20 mg/kg LM	408 ^b

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \geq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 18

Während der Phase der hohen Dosierung traten signifikant niedrigere Harnstoffkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollphase ($p \leq 0,001$) und zur Phase der niedrigen Dosierung ($p = 0,029$) auf. Die Werte in der Kontrollphase und in der Phase der niedrigen Dosierung sind demgegenüber identisch. Ein in Abb. 36 zu erkennender Rebound-Effekt auf die Harnstoffwerte nach der ca. 18stündigen Futterrestriktion, ist bei der Bewertung der Daten mit zu berücksichtigen.

4.2.7.6 Glucose

Die Gehalte von Glucose wurden in den präprandial gewonnenen 8.00 Uhr Proben in zweitägigem Abstand gemessen. Aus den Werten wurde für jedes Tier der Mittelwert jeder Versuchsphase berechnet und die LSmeans untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 40 dargestellt.

Tab. 40 LSmeans der mittleren Glucose Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) in der Kontroll-, niedrigen- und hohen Dosierungsphase während des Compound B4 per os Durchgangs (n = 7)

Phase	Glucose ($\mu\text{g/ml}$)
Kontrolle	614,3 ^a
10 mg/kg LM	631,4 ^a
20 mg/kg LM	617,5 ^a

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \geq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 13,9

Die Glucosekonzentration im Blutplasma war in der Kontrollphase mit 614,3 $\mu\text{g/ml}$ annähernd identisch wie der Wert in der Phase der niedrigen Dosierung mit 631,4 $\mu\text{g/ml}$ und in der Phase der hohen Dosierung mit 617,5 $\mu\text{g/ml}$. Die Betrachtung der Mittelwerte der Phasen der Einzeltiere zeigte ebenfalls keinen einheitlichen Verlauf im Sinn einer Steigerung oder Reduzierung der Glucosewerte. Es konnte daher keine Beeinflussung der Glucosekonzentration im Blutplasma durch Compound B4 erkannt werden.

4.2.7.7 Schilddrüsenhormone T3 und T4

Die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone T3 und T4 wurden von Dr. L. Thomas, Boehringer Ingelheim GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt.

Die Messungen der Schilddrüsenhormone T3 und T4 fand in jeweils vier 8.00 Proben jeder Versuchsphase statt. Aus den vier gemessenen Konzentrationen wurde für jede Phase der Mittelwert ermittelt und varianzanalytisch untersucht. Die nach der Methode der kleinsten Quadrate geschätzten Randmittelwerte (LSmeans) der Phasen sind für T3 in Tab. 41 und für T4 in Tab. 42 wiedergegeben.

Tab. 41 LSmeans der mittleren T3-Konzentration (nmol/l) in der Kontrollphase, der niedrigen- und hohen Dosierungsphase während des Compound B4 per os Durchgangs (n = 7)

Phase	T3 (nmol/l)
Kontrolle	0,809 ^a
10 mg/kg LM	0,817 ^a
20 mg/kg LM	0,786 ^a

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \geq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 0,027

Tab. 42 LSmeans der mittleren T4-Konzentration (nmol/l) in der Kontrollphase, der niedrigen- und hohen Dosierungsphase während des Compound B4 per os Durchgangs (n = 7)

Phase	T4 (nmol/l)
Kontrolle	49,0 ^a
10 mg/kg LM	49,3 ^a
20 mg/kg LM	49,6 ^a

LSmeans in einer Spalte, die mit demselben Buchstaben versehen sind, sind nicht signifikant voneinander verschieden ($p \geq 0,05$). Der Standardfehler beträgt 2,0

Die *per os* Applikation von Compound B4 hatte weder auf das Schilddrüsenhormon T3 noch auf T4 einen signifikanten Einfluss. Es konnte keine Veränderung der Schilddrüsenhormone zwischen den Phasen festgestellt werden.

4.2.8 Subjektive Verhaltensbefunde

Nach Beginn der niedrigen Compound B4 Dosierung zeigten die Tiere eine zunehmende Motivationslosigkeit. Dies drückte sich im Verlauf der Compound B4 Verabreichung mit verlängerten Liegezeiten und steigender Unlust auf Spielversuche mit dem Versuchsbetreuer aus. Ebenfalls beobachtet wurde ein leicht apathisches Verhalten der Tiere beim Betreten des Stalls durch das Betreuungspersonal. Dabei kam es im Normalfall mindestens zu Lautäußerungen durch die Tiere, wenn nicht sogar zum Aufstehen und verstärktem Bewegungsdrang. Dieses Verhalten konnte während der Compound B4 Verabreichung höchstens in einem stark herabgesetzten Maß festgestellt werden.

5 Diskussion

5.1 Pharmakokinetik von Sibutramin und Compound B4

Trotz der geringeren Dosierung bei *i.v.* (2mg/kg LM) im Vergleich zur *per os* (20 mg/kg LM) Applikation kam es infolge der *intravenösen* Verabreichung von Sibutramin zu einer schneller und höher anflutenden C_{\max} von Sibutramin und seinem ersten Metaboliten Desmethyl-Sibutramin (M1) als bei *per os* Gabe. Dieser Anstieg war jedoch beim zweiten Metaboliten Didesmethyl-Sibutramin (M2) nicht mehr zu beobachten. Hier zeigte sich vielmehr ein höherer Anstieg von C_{\max} als auch des AUC für M2 nach der Verabreichung *per os* im Vergleich zu *i.v.* (siehe Tab. 43).

Tab. 43 Übersicht der AUC ($\text{ng} \times \text{h} \times \text{ml}^{-1}$) von Sibutramin und Metaboliten, M1 und M2, bei Spezies Mensch, Ratte und Schwein nach verschiedenen Dosierungen und Applikationsformen

Spezies	Dosis	AUC ($\text{ng} \times \text{h} \times \text{ml}^{-1}$)			Literatur
		Sibutramin	M1	M2	
Mensch	10 mg/d <i>per os</i>	k.A.	37,2	97,7	(Zhi et al., 2002)
	15 mg/d <i>per os</i>	k.A.	23	135	(Hind et al., 1999)
Ratte	10 mg/kg LM <i>per os</i>	73	113	2894	(Lotz, 2005)
Schwein	20 mg/kg LM <i>per os</i>	49	33	513	eigene Daten
	2 mg/kg LM <i>i.v.</i>	3853	239	225	eigene Daten

In den durchgeführten Studien am Schwein konnte daher eine divergierende Pharmakokinetik von Sibutramin und seinen Metaboliten, hier vor allem von M2, in Abhängigkeit von der Applikationsart nachgewiesen werden. Von Sibutramin ist ein ausgiebiger First-pass Metabolismus in der Leber und eine kurze Halbwertszeit bekannt. Sibutramin entfaltet seine pharmakologische Wirkung allerdings auch hauptsächlich über seinen primären und sekundären Metaboliten, Desmethyl-Sibutramin und Didesmethyl-Sibutramin (Zhi et al., 2002).

Die in diesem Versuch gemessenen Konzentrationen von Sibutramin, M1 und M2 sind im Bereich, der bei einer therapeutischen Behandlung erreichten Konzentrationen beim Menschen bzw. im Fall von M2 etwas höher. Sie liegen allerdings, vor allem auf M2 bezogen, deutlich unter dem Niveau, welches bei Versuchen mit Ratten ermittelt wurde. Im Hinblick auf die weitere Diskussion sollten deshalb die Ergebnisse der Sibutraminkonzentrationen im Blutplasma, vor allem der des pharmakologisch wirksamen Metaboliten Didesmethyl-Sibutramin (M2) mit berücksichtigt werden.

Die Konzentrationen von Compound B4 im Blutplasma zeigten nach einer Dosierung von 10 mg/kg LM bzw. 20 mg/kg LM einen von der Höhe der Dosierung abhängigen Verlauf. Nach einer persönlichen Auskunft von Hr. Dr. Schindler (Stoffwechselforschung, BoehringerIngelheim, Biberach, Deutschland) befinden sich die Konzentrationen von Compound B4 in einem Bereich, der um den ca. 2-3fachen Faktor geringer ist als jener, der bei Ratten in pharmakologischen Studien angestrebt wird. Es könnte daher sein, dass die beim Schwein erreichten Konzentrationen von Compound B4 im Blutplasma am unteren Limit zur Auslösung der gewünschten pharmakologischen Effekte liegen.

5.2 Wachstum, Futter- und Wasseraufnahme

Die Futteraufnahme der Tiere war sowohl während der Applikation von Sibutramin *per os* als auch während der Applikation von Compound B4 signifikant und dosisabhängig reduziert (siehe 0 bzw. 0). Diese dosisabhängige Reduktion der Futteraufnahme lässt eindeutig auf einen sowohl für Sibutramin (Barkeling et al., 2003; Brown et al., 2001; Connoley et al., 1999; Hansen et al., 1998; Hauner et al., 2004; James et al., 2000) als auch für einen bei diversen anderen MCH-R1 Antagonisten (Borowsky et al., 2002; Kym et al., 2005; Mashiko et al., 2005; Shearman et al., 2003; Souers et al., 2005; Takekawa et al., 2002), beschriebenen pharmakologischen Effekt schließen. Zumal die Futteraufnahmekurve von unbehandelten Schweinen, die sich in diesem Gewichtsabschnitt befinden, eine steigende Tendenz zeigt (Kirchgeßner, 1997).

Während des Sibutramin *per os* Durchgang war die Reduktion der Futteraufnahme während der Zeiten in denen die Tiere in den Stoffwechselkäfigen untergebracht waren, auffällig. Diese Reduktion der Futteraufnahme kann auf die, in den Stoffwechselkäfigen, verringerte Grundfläche zurückgeführt werden (Brumm, 1996). Da die Tiere während des Sibutramin *intravenös* Durchgangs ebenfalls in Stoffwechselkäfigen untergebracht wurden, ist eine direkte Vergleichbarkeit der Futteraufnahmen dieser beider Durchgänge gegeben. Im zweiten Projektteil „Compound B4“ wurde allerdings auf die Stoffwechselkäfige verzichtet. Daher kann hier die Futteraufnahme nicht mehr zwischen den Durchgängen sondern nur noch zwischen den Phasen innerhalb des Durchgangs verglichen werden.

Der Verlauf der Futteraufnahme der Schweine während des Sibutramin *intravenös* Durchgangs zeigte sowohl bei den mit Sibutramin behandelten Tieren, während der Phase der hohen Dosierung, als auch bei den Placebotieren im selben Zeitraum eine signifikante Reduktion der Futteraufnahme (siehe 0). Die Placebotiere hatten schon zu Beginn der Untersuchung einen höheren Körperfettgehalt als die Behandlungstiere. Ein erhöhter Körperfettgehalt ist im allgemeinen mit einem erhöhten Leptingehalt (Barb et al., 2001) sowie einem verminderten Adiponektingehalt (Staiger and Häring, 2005) korreliert. Beides führt letztendlich über die Reduktion von NPY bzw. der Stimulation von CART zu einer verminderten Futteraufnahme. Darüber hinaus ist bekannt, dass Sibutramin bei mageren jungen Ratten im Vergleich zu dicken alten Ratten eine geringere Wirksamkeit zeigt (Strack et al., 2002).

Über die Ursachen, für den schon zu Beginn des Durchgangs, erhöhten Körperfettgehalte bei den Placebotieren kann nur spekuliert werden. Sie waren zu diesem Zeitpunkt in derselben

Gewichtsklasse (97 ± 3 kg) und im selben Alter (167 ± 2 Tage). Ob die Reduktion der Futteraufnahme, der mit Sibutramin *intravenös* behandelten Tiere auf einen pharmakologischen Effekt zurückzuführen ist oder ob Durchgangseffekte während dieses Zeitraums einen Einfluss auf die Futteraufnahme der Tiere beider Behandlungsgruppen hatte, kann daher anhand des durchgeführten Versuchsdesigns und der erfassten Parameter im Sibutramin *intravenös* Durchgang nicht eindeutig geklärt werden.

Die Tatsache, dass die dosisabhängige, signifikant verminderte Futteraufnahme während des Sibutramin *per os* und des B4 Durchgangs, nicht zu einem signifikant verminderten täglichen Wachstum führte, könnte mit dem in diesem Gewichtsabschnitt die Tiere kennzeichnenden hohen Proteinansatzvermögen zusammenhängen. Obwohl die Tiere in der Phase der hohen Dosierung rund 800 g/d weniger Futter fressen als in der Kontrollphase, können sie mit dieser aufgenommenen Futtermenge immer noch ihren Bedarf, sowohl an Protein als natürlich auch an Energie, für ihr genetisch determiniertes Muskelwachstum decken. Die für den Muskelansatz nicht benötigte Energie wird in Form von Fett angesetzt. In Protein sind ca. 22,6 kJ pro Gramm und in Fett ca. 39,0 kJ pro Gramm enthalten. Ein Gramm Proteinansatz erhöht aufgrund des hohen Wasserbindungsvermögens den Gewichtszuwachs etwa um das Vierfache, während ein Gramm Fettansatz den Gewichtszuwachs nur um etwa das 1,1 fache steigert. Tatsächlich könnte dieser Sachverhalt letztendlich zu, im beobachteten Zeitraum von vier Wochen, nicht signifikant veränderten durchschnittlichen täglichen Zunahmen führen.

Während des Sibutramin *per os* Durchgangs konnte bei den Behandlungstieren ein durchschnittlicher täglicher Wasserverbrauch von 32 l in der Kontrollphase, 30 l in der Phase der niedrigen Dosierung und 21 Litern in der Phase der hohen Dosierung gemessen werden (siehe 4.1.5). Damit lag der Wasserverbrauch um 10-20 Litern über dem Verbrauch der Placebotiere in den entsprechenden Zeiträumen. Da die Behandlungsgruppe allerdings schon während der Kontrollphase einen physiologisch ungewöhnlich, hohen Wasserverbrauch zeigte, war davon auszugehen dass sicherlich nicht das komplett verbrauchte Wasser aufgenommen wurde. Wahrscheinlich wurde es von den Tieren teilweise verspielt oder zu Zwecken der Körperkühlung gebraucht. Weiterhin besteht aber auch die Möglichkeit, dass die Tiere der Behandlungsgruppe den penetrant bitteren Geschmack von Sibutramin durch Spülen der Maulhöhle neutralisieren wollten und deshalb ein stark schwankender und ungewöhnlich hoher Wasserverbrauch zustande kam. Bei den Tieren der Sibutramin *intravenös* Gruppe lag der Wasserverbrauch um ca. 2 Liter über dem Wasserverbrauch der Placebotiere (siehe 4.1.5). Auch in diesem Durchgang zeigte sich, wie im *per os* Durchgang, ein stark schwankender

Verlauf des Wasserverbrauchs mit Spitzen, die bis zu 37 l/d aufwiesen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Tiere nicht das komplett verbrauchte Wasser tatsächlich aufgenommen haben, sondern es zum Teil verspielten. Trotz dieser Unwägbarkeiten in Bezug auf die Messung der Wasseraufnahme während des Projektteils „Sibutramin“ gibt es in der Literatur Befunde, die eine erhöhte Wasseraufnahme, bei gleichzeitiger Reduktion der Futteraufnahme, unter der Behandlung mit selektiven Serotonin Wiederaufnahmehemmern bei der Ratte beschreiben (McCann et al., 1997). Bei den mit Sibutramin behandelten Tieren bleibt daher festzuhalten, dass der teilweise sehr hohe Wasserverbrauch ein Hinweis auf eine durch Sibutramin, pharmakologisch bedingte, erhöhte Wasseraufnahme darstellt. Darüber hinaus ist denkbar, dass die durch Sibutramin gesteigerte Thermogenese (Connoley et al., 1999) und ein damit verbundener erhöhter Kühlungsbedarf der Tiere, eine nicht zu unterschätzende Rolle bei dem ermittelten hohen Wasserverbrauch spielt. Da die teils stark schwankenden Verlaufskurven des Wasserverbrauchs während beider Sibutramin Durchgänge, nicht zufrieden stellend waren, wurden für den zweiten Projektteil „Compound B4“ Tränkebecken, für eine nahezu verlustfreie Messung der Wasseraufnahme eingebaut (Mod. 85, Suevia Haiges GmbH, Kirchheim am Neckar, Deutschland).

Die mit den neuen Tränkebecken optimierte Messung der Wasseraufnahme ergab mit ca. 5 l/d (siehe 4.2.5) während des Compound B4 Durchgangs erheblich reduzierte Wasseraufnahmemengen als während der Messung mit den davor eingesetzten Tränkebecken (siehe 4.1.5). Des Weiteren konnte mit den neuen Tränkebecken auch Augenscheinlich kein verspielen des Wassers mehr festgestellt werden. Damit war sichergestellt, dass das gemessene Volumen des Wasserverbrauchs tatsächlich der Wasseraufnahme entsprach.

Während der Applikation von Compound B4 konnte eine dosisabhängige, signifikante Reduktion der Wasseraufnahme festgestellt werden (siehe 4.2.5). Diese Reduktion der Wasseraufnahme kann mit der im gleichen Durchgang festgestellten, dosisabhängigen, signifikanten Reduktion der Futteraufnahme in Verbindung gebracht werden. Da den Tieren das Futter trocken verabreicht wurde, mussten diese ihre Wasseraufnahme der TS-Aufnahme anpassen. Reduziert sich die Futteraufnahme müsste sich folglich auch die Wasseraufnahme reduzieren. Genau so gut wäre aber auch eine spezifische Reduktion der Wasseraufnahme durch Compound B4 denkbar. Es ist bekannt, dass bei der Ratte, nach i.c.v. verabreichtem MCH die Wasseraufnahme, unabhängig von der Futteraufnahme ansteigt (Clegg et al., 2003). Folglich müsste bei der Verabreichung eines MCH-R1 Antagonisten die Wasseraufnahme sinken. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Ratte, kommt es allerdings beim Schaf, nach

i.c.v. verabreichtem MCH, nicht zu einer Stimulation der Wasseraufnahme, aber interessanterweise zu einer Erhöhung des Urinvolumens (Parkes, 1996).

5.3 Proteinanabole GH/IGF-I Achse und Harnstoff

Die GH/IGF-I Achse ist maßgeblich an der Regulation der Futteraufnahme beteiligt. Wachstumshormon (GH) stimuliert indirekt die Proteinsynthese, durch die verstärkte IGF-I Sekretion in der Leber und hat einen Einfluss auf die Energieverteilung zwischen den Körpergeweben, da es die Lipolyse fördert. Damit in der Leber bei hohen GH-Konzentrationen vermehrt IGF-I gebildet werden kann, ist die Grundvoraussetzung, dass genügend Energie in Form von Glucose aus der Nahrung bereit steht (Claus and Weiler, 1994). Die exogene Verabreichung von pGH führt beim Schwein zu einer verringerten Futteraufnahme, einer verbesserten Futtermittelverwertung und einem gleich bleibenden absolutem Wachstum, allerdings mit einem erhöhtem Muskelfleischansatz (Klindt et al., 1998).

Weder die Verabreichung des Serotonin-Noradrenalin Wiederaufnahmehemmers Sibutramin noch die des MCH-R1 Antagonisten „Compound B4“ hatte einen Einfluss auf die Wachstumshormonsekretion (siehe 4.1.7.1 und 4.2.7.1).

Interessanterweise konnten aber bei den Tieren, die mit Sibutramin *per os* behandelt wurden, trotz einer reduzierten Futteraufnahme, signifikant erhöhte IGF-I Konzentrationen sowohl in der Phase der niedrigen Dosierung als auch in der Phase der hohen Dosierung festgestellt werden (siehe 4.1.7.2). Wogegen während des Sibutramin *intravenös* Durchgangs keine Veränderung der IGF-I Konzentration eintrat (siehe 4.1.7.2).

Sowohl eine verminderte Futteraufnahme (Berschauer, 1977) als auch eine Erhöhung der endogenen IGF-I Konzentration (Klindt et al., 1992) führt zu einer Reduktion der Harnstoffkonzentrationen im Blutplasma. Im Sibutramin *per os* Durchgang wurde eine dosisabhängige, signifikante Reduktion der Harnstoffkonzentration im Blutplasma gemessen (siehe 4.1.7.5). Die sinkenden Harnstoffkonzentrationen können teilweise auf die verringerte Futteraufnahme zurückgeführt werden.

Zusammenfassend deutet die Steigerung der IGF-I Konzentration, bei gleichzeitiger Reduktion der Harnstoffkonzentration allerdings auf eine pharmakologisch, durch Sibutramin beeinflusste Verschiebung des Energieansatzes, weg vom Fettansatz in Richtung des Proteinansatzes hin. Diese These unterstützend tritt nach der Verabreichung von Sibutramin vor allem eine Reduktion von kohlenhydrat- und fettreichen Rationen ein, währenddessen die Aufnahme von proteinreichen Rationen nahezu unbeeinflusst bleibt (LeBlanc and Thibault, 2003).

Die IGF-I Konzentration ist während des „Compound B4“ Durchgangs signifikant, wenngleich nicht dosisabhängig, von der Kontrollphase mit 79,4 ng/ml auf 67,9 ng/ml in der Phase der niedrigen Dosierung bzw. auf 72,1 ng/ml in der Phase der hohen Dosierung reduziert (siehe 4.2.7.2). Im selben Zeitraum reduzierte sich die Harnstoffkonzentration, zumindest während der Phase der hohen Dosierung signifikant im Vergleich zur Kontrollphase (siehe 4.2.7.5). Beim Verlauf der täglichen Harnstoffkonzentration kann am Versuchstag 14 und 15 ein erheblicher Einbruch, verursacht durch die bei der Körperfettmessung mittels D₂O notwendige Futterrestriktion an Tag 13, festgestellt werden. Bemerkenswerterweise kommt es im Anschluss daran zu einem Rebound-Effekt, sodass die Harnstoffwerte an den Versuchstagen 16 – 21 kontinuierlich auf ein Maximum von 474 ng/ml ansteigen. Nach dem Tag 21 sinken sie dann wieder bis zum Ende des Versuchs auf ein Niveau von ca. 410 ng/ml (siehe Abb. 36).

In Folge der dosisabhängigen Reduktion der Futterraufnahme sinken die Konzentrationen von IGF-I und Harnstoff bei der Verabreichung von Compound B4. Interessanterweise treten bei MCH-R1 Knockout-Mäusen, um 19% erniedrigte IGF-I Konzentrationen im Vergleich zum Wildtyp auf (Bjursell et al., 2005). Es wäre daher ebenfalls eine direkte pharmakologische Beeinflussung der IGF-I Konzentrationen durch den MCH-R1 Antagonisten „Compound B4“ denkbar.

5.4 Cortisol- und Aldosteronkonzentration

Die Cortisolkonzentration im Blutplasma wurde weder durch die *intravenöse* noch durch die *per os* Verabreichung von Sibutramin beeinflusst (siehe 4.1.7.3). Bisherige Untersuchungen über die Auswirkungen von Sibutramin auf die Cortisolkonzentration liegen nicht vor. Allerdings führten andere 5-HT beeinflussende Wirkstoffe bei Ratten zu einer Erhöhung der Corticosteronkonzentration (Fuller, 1992).

Zur Überprüfung ob Sibutramin möglicherweise die Aldosteronkonzentration im Blutplasma beeinflusst, wurde diese in den Blutplasmaproben aus dem Sibutramin *per os* Durchgang gemessen. Zwischen den Phasen konnte keine Veränderung der Aldosteronkonzentration, weder in der Behandlungs- noch in der Kontrollphase, ermittelt werden. Allerdings trat ein, in der Phase der niedrigen Dosierung sogar signifikanter Unterschied des Mittelwerts zwischen den Gruppen auf (siehe 4.1.7.4). Die Ursachen für diesen Niveauunterschied liegen, da er bereits in der Kontrollphase auftrat, in tierindividuellen Unterschieden. Eine Beeinflussung von Aldosteron durch Sibutramin konnte nicht gefunden werden. In der Literatur liegen keine Untersuchungen über die Auswirkungen von Sibutramin auf die Aldosteronkonzentration vor.

Die Funktion von MCH auf die HPA-Achse wurde teilweise kontrovers diskutiert (siehe 2.5.3.2). Grundsätzlich zeigen neuere Untersuchungen allerdings einen stimulierenden Effekt von MCH auf die HPA-Achse (Ashmeade et al., 2000; Kennedy et al., 2003). Somit wäre ein eher inhibierender Effekt des MCH-R1 Antagonisten Compound B4, auf die HPA-Achse zu erwarten. Tatsächlich konnten während der Behandlung der Tiere mit Compound B4, in der Phase der hohen Dosierung sogar signifikant, reduzierte Konzentrationen von Cortisol im Blutplasma, im Vergleich zur Kontrollphase, nachgewiesen werden (siehe 4.2.7.3). Allerdings traten tierindividuelle Unterschiede auf. So stieg bei einem Tier die Cortisolkonzentration unter der Behandlung mit Compound B4 an. Bei einem weiteren Tier konnte nur in der Phase der hohen Dosierung eine Verminderung beobachtet werden.

Der inhibierende Effekt von Compound B4 auf die Cortisolkonzentration ist in Übereinstimmung mit dem allgemein inhibierenden Effekt, eines anderen MCH-R1 Antagonisten auf die HPA-Achse (Kennedy et al., 2003).

Die Verabreichung von Compound B4 führte zu keiner Veränderung der Aldosteronkonzentration (4.2.7.4) im Blutplasma der verwendeten wachsenden Schweine. In

der derzeitig einzigen Untersuchung zu diesem Zusammenhang wurde nach der i.c.v. Verabreichung von MCH eine reduzierte Aldosteronkonzentration im Blutplasma von Schafen gemessen (Parkes, 1996). Diesem Ergebnis entsprechend müsste man nach der Verabreichung eines MCH-R1 Antagonisten eine erhöhte Aldosteronkonzentration feststellen, was aber so in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte.

5.5 Schilddrüsenhormone und Glucosekonzentrationen im Blutplasma

Die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen (HPT) Achse spielt eine herausragende Rolle in der Regulation der Energiehomöostase. Schilddrüsenhormone steuern den Grundumsatz und fördern dosisabhängig den Eiweiß-, Kohlenhydrat-, Fett-, Wasser- und Mineralstoffwechsel. Eine Beeinflussung der HPT-Achse durch Sibutramin ist in der Literatur nicht beschrieben. Die direkte Wirkung von 5-HT wird hingegen kontrovers diskutiert (Aghajanian and Sanders-Bush, 2004). Von MCH ist bekannt, dass es bei Ratten die TRH und TSH Sekretion reduziert (Kennedy et al., 2001). Um eine mögliche Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen Achse durch Sibutramin oder Compound B4 zu untersuchen, wurden die Konzentrationen der Schilddrüsenhormone T3 und T4 im Blutplasma bestimmt.

Die T3 Konzentrationen im Blutplasma steigen während des Zeitraums der niedrigen und hohen Dosierung im Vergleich zur Kontrollphase sowohl in der Sibutramin- als auch in der Placebogruppe signifikant an (siehe 4.1.7.7). Da aus der Literatur keine Befunde zu einer Beeinflussung der Schilddrüsenhormone durch Sibutramin vorliegen und da der Anstieg innerhalb der Placebogruppe ein gleich hohes Ausmaß wie in der Sibutramingruppe aufweist, muss von einem umweltbedingten Einfluss auf die T3 Konzentration ausgegangen werden. Abb. 27 zeigt diesbezüglich, dass es zu einer Reduktion der Umgebungstemperatur von 30°C auf 21°C am zehnten Versuchstag kommt. In diesem Versuchsabschnitt kann noch keine Steigerung der T3 Konzentrationen beobachtet werden. Anschließend kommt es am 25. Versuchstag zu einer weiteren Temperatursenkung. Dies ist dann genau der Zeitpunkt an dem auch die T3 Konzentrationen steigen. Es ist bekannt, dass beim Schwein die Blutplasmagehalte der Schilddrüsenhormone T3 und T4 nach einer Temperatursenkung steigen (Herpin et al., 1987). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass dem Anstieg der T3 Konzentration im Blutplasma eher temperaturbedingte als pharmakologische Ursachen zugrunde liegen.

Den Befunden von Herpin widersprechend, konnte allerdings keine Veränderung der T4 Konzentrationen im Blutplasma im Verlauf des Sibutramin per os Durchgangs festgestellt werden (siehe 4.1.7.7).

Im Gegensatz zu den Befunden aus der Literatur, die eine inhibierende Wirkung von MCH auf die HPT-Achse beschreibt (Kennedy et al., 2001) und somit die Vermutung nahe liegt,

dass bei der Applikation eines MCH-R1 Antagonisten eine stimulierende Wirkung auf die Schilddrüsenhormone auftritt, konnten keine Veränderung, weder der T3 noch der T4 Konzentrationen im Blutplasma während der Verabreichung von Compound B4 festgestellt werden (siehe 4.2.7.7)

6 Zusammenfassung

Die Regulation der Nahrungs- bzw. Futteraufnahme ist ein hochaktuelles Forschungsgebiet sowohl der Tierhaltung als auch der Humanmedizin. Dabei richtet sich das Interesse der Medizin vorrangig auf eine Reduzierung der Nahrungsaufnahme bei gleichzeitiger Veränderung des Stoffwechsels in Richtung einer erhöhten Energieverbrauches, um so der zunehmenden Fettleibigkeit („metabolisches Syndrom“) gegenzusteuern. Damit sind aus der pharmakologischen Forschung Substanzen vorhanden, mit denen die im Zwischenhirn (Hypothalamus) gelegenen Zentren beeinflusst werden, welche die Nahrungsaufnahme und Energieverwertung steuern. Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten wurden zwei derartige Substanzen in ihrer Auswirkung auf das Schwein näher untersucht. Aus den Ergebnissen ist ein vertieftes Verständnis der entsprechenden Abläufe beim Schwein als einem der wichtigsten landwirtschaftlichen Nutztiere zu erwarten. Zudem ist das Schwein auch ein geeignetes Modell für humanpharmakologische Fragestellungen, da es in seinen physiologischen Gesamtabläufen dem Menschen weit ähnlicher ist, als die Ratte als übliches Modelltier.

6.1 Versuchsablauf

Es wurden zwei unterschiedliche Regulationssubstanzen untersucht, einerseits ein Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (Sibutramin), andererseits der Melanin-concentrating hormone receptor antagonist (MCH-R1 Antagonist; Compound B4). Zur Erfassung der Wirksamkeit wurden die Futteraufnahme, die Wasseraufnahme, die Gewichtsentwicklung, die Futtermittelverwertung und die Entwicklung der Körperfettmasse gemessen. Die dadurch bedingten Veränderungen der Stoffwechselregulation wurden über anabole (Wachstumshormon und IGF-1) und katabole (Cortisol und Aldosteron) Hormone erfasst. Zusätzlich wurden die Schilddrüsenhormone und Blutharnstoff als Parameter der Proteinverwertung bestimmt.

Die Untersuchung gliederte sich in drei, je sechswöchige Versuchsdurchgänge. Im ersten Versuchsdurchgang wurde Sibutramin *per os* an drei Versuchstiere verabreicht und drei Versuchstiere als Kontrollgruppe gehalten. Im zweiten Durchgang wurde Sibutramin *intravenös* an zwei Versuchstiere verabreicht und zwei Kontrolltiere gehalten. Im dritten Durchgang wurde der MCH-R1 Antagonist *per os* an sechs Versuchstiere verabreicht. Nachfolgend sind die Ergebnisse charakterisiert.

6.2 Ergebnisse der Sibutraminverabreichung

Die pharmakologische Wirkung von Sibutramin wird hauptsächlich durch seine Metaboliten erklärt (Desmethyl-Sibutramin und Didesmethyl-Sibutramin). Bei der *per os* Aufnahme von 20mg/kg LM Sibutramin konnte sowohl für die Muttersubstanz Sibutramin als auch beim Metaboliten Desmethyl-Sibutramin eine niedrigere Konzentration im Blutplasma als nach *intravenöser* Applikation festgestellt werden. Dahingegen war die Konzentration des Metaboliten Didesmethyl-Sibutramin bei *per os* Applikation höher als nach *intravenöser* Applikation. Da die Wirksamkeit von Sibutramin im wesentlichen auf seinem Metaboliten Didesmethyl-Sibutramin beruht, war die Art der Applikation ausschlaggebend für die Wirksamkeit, d.h. die intravenöse Verabreichung war unwirksam.

Die Futteraufnahme war nach oraler Applikation signifikant und dosisabhängig reduziert, führte aber nicht zu reduzierter Lebendmassezunahme der Tiere. Auch auf die Futtermittelfermentation konnte keine Auswirkung festgestellt werden. Dahingegen führte die Behandlung zu einem dramatisch erhöhten Wasserverbrauch. Die Verabreichung von Sibutramin hatte keinen Einfluss auf die Wachstumshormonsekretion. Allerdings war die IGF-1 Konzentration erhöht, obwohl die Futteraufnahme reduziert war. Die Cortisolkonzentrationen im Blutplasma wurden durch die Behandlung nicht beeinflusst.

6.3 Ergebnisse der Verabreichung des MCH-Antagonisten

Die Verabreichung des Antagonisten führte zu einer dosisabhängigen signifikanten Reduzierung der Futteraufnahme. Bei den mittleren täglichen Zunahmen wurden erhebliche tierindividuelle Unterschiede festgestellt, so dass die Reduzierung der täglichen Zunahmen nicht signifikant war. Ob die Veränderung der Wasseraufnahme, die auch bei diesem Versuchsteil nachweisbar war, auf den Wirkstoff zurückzuführen ist, oder auf der verminderten Futteraufnahme beruht, konnte nicht geklärt werden. Tendenziell war zu erkennen, dass während der Compound B4 Verabreichung Energiesparmechanismen ausgelöst wurden, die sich auf Stoffwechselhormone auswirken. So war z.B. IGF-1 in der Kontrollphase geringfügig aber signifikant reduziert. Weder Sibutramin noch der MCH-Antagonist führten zu einer Beeinflussung der Schilddrüsenfunktion sowie der Cortisolkonzentrationen.

6.4 Schlussfolgerungen

Die Untersuchungen zeigen, dass der MCH-Antagonist beim Schwein zu einer signifikant reduzierten Futteraufnahme führt, während die Stoffwechselregulierenden Hormone und damit die Energieverwertung unbeeinflusst blieben. Nachgewiesen wurde damit auch, dass sich das Schwein als Modelltier für derartige humanpharmakologische Arbeiten eignet. Nachteilig ist allerdings der hohe Bedarf an Testsubstanzen, der bei der Neuentwicklung von Pharmaka und damit der Synthese zunächst geringer Substanzmengen limitierend ist.

7 Summary

The regulation of food- and feed intake is a highly topical investigative area in animal husbandry as well as in human medicine. Here the focus of medicine is primarily on the reduction of food intake and at the same time change of the metabolism to increased energy expenditure in order to counteract the rising number of adiposity and metabolic syndrome. Therefore, substances from pharmacological research are known which act in different nuclei of the hypothalamus and control food intake and energy expenditure. In the present study two of these new substances were examined with regards to their impact on pigs. The results lead to a more detailed understanding of the corresponding mechanisms in pigs, one of the most important animals used in agriculture. In addition, the pig is also a suitable model for human pharmacological research, as it equals the human physiological regulation more than the rat, which is the most common animal model.

7.1 Study work flow

Two different regulative substances were examined, on the one hand a serotonin noradrenalin reuptake inhibitor (Sibutramine) and on the other hand, a melanin concentrating hormone receptor antagonist (MCH-R1 antagonist; Compound B4). For the evaluation of the effectiveness the following factors were measured; feed intake, water consumption, weight gain, feed conversion rate and the development of body fat content. The changes caused in the regulation of the metabolism were evaluated by anabolic (Growth hormone and IGF-I) and catabolic (cortisol and aldosterone) hormones. In addition, thyroid hormones and urea in the blood plasma were measured as a parameter of protein turnover.

The study was divided in three trials, each of them taking six weeks. During the first trial sibutramine was given *per os* to three animals and three animals were kept as control. During the second trial sibutramine was given intravenously to two animals and two animals were kept as control. During the third trial the MCH-R1 antagonist, Compound B4, was given *per os* to six animals. The results are described in the following sections.

7.2 Results of the sibutramine application

The pharmacological effectiveness of sibutramine is mainly explained through its metabolites (desmethyl sibutramine and didesmethyl sibutramine). It was found that for the *per os* intake of 20 mg/kg LW sibutramine, as well as sibutramine as the first metabolite desmethyl-sibutramine, a lower concentration in the blood plasma existed compared to the *intravenous*

application. Whereas concentration of the second metabolite didesmethyl-sibutramine was higher for *per os* application than for *intravenous* application.

Since the effectiveness of sibutramine is mainly based on its second metabolite didesmethyl-sibutramine, the way of application was crucial for its effectiveness. This means that the intravenous application was ineffective.

After *per os* application feed intake was significantly reduced, also dependent on the dose applied, but did not lead to a reduced weight gain of the animals. Further, no impact was found on the feed conversion ratio. In contrast, the treatment with sibutramine *per os* led to significantly increased water consumption. The application of sibutramine had no impact on the growth hormone secretion. However, IGF-1 concentration was increased while feed intake was decreased. The cortisol concentration in blood plasma was not impacted by any treatment.

7.3 Results of the application of the MCH-R1 antagonist (Compound B4)

The application of the antagonist led to a significant reduction of feed intake, dependent on the dose applied. The means derived for daily weight gain show considerable individual differences per animal, hence the reduction of daily weight gain overall was not significant. Further, changes in water consumption were also detected in this trial. However, it could not be clarified if this was caused by the application of the antagonist or the reduced feed intake. Generally, the application of Compound B4 tends to result in energy saving mechanisms, which have an impact on metabolic active hormones. IGF-1 for example, was slightly lower in the control phase. Neither sibutramine nor the MCH-R1 antagonist Compound B4 had any impact on the concentration of thyroid hormones or cortisol.

7.4 Conclusions

The studies have shown that the MCH-R1 antagonist leads to a significant reduction of feed intake in pigs, whereas the metabolic active hormones, and therefore the energy expenditure, do not seem to be impacted at all. In addition, it was proven that the pig is a useful animal model for such human pharmacological investigations. However, the large amount of substances required can be seen as disadvantageous and as a limiting factor in the investigation of new agents with an initially small amount of substance synthesis.

8 Literaturverzeichnis

- Adams, G. B. and J. M. Forbes. 1981. Additivity of effects of ruminal acetate and either portal propionate or rumen distension on food intake in sheep. *Proceedings of the Nutrition Society* 40:44a.
- Adrian, T. E., A. J. Bacarese-Hamilton, H. A. Smith, P. Chohan, K. J. Manolas, and S. R. Bloom. 1987. Distribution and postprandial release of porcine peptide YY. *J Endocrinol* 113:11-14.
- Aghajanian, G. K. and E. Sanders-Bush. 2004. Serotonin. In: *Neuropsychopharmacology: The fifth Generation of Progress*.
- Ashmeade, T. E., D. N. C. Jones, R. P. Munton, C. Shilliam, J. E. Gartlon, F. Parker, G. Hervieu, and C. A. Heidbreder. 2000. An investigation into the effect of melanin concentrating hormone on neuroendocrine markers in the rat. *European Journal of Neuroscience* 12:476.
- Bachner, D., H. Kreienkamp, C. Weise, F. Buck, and D. Richter. 1999. Identification of melanin concentrating hormone (MCH) as the natural ligand for the orphan somatostatin-like receptor 1 (SLC-1). *FEBS Letters* 457:522-524.
- Badman, M. K. and J. S. Flier. 2005. The Gut and Energy Balance: Visceral Allies in the Obesity Wars. *Science* 307:1909-1914.
- Baldwin, B. A. and T. A. Cooper. 1979. The effects of olfactory bulbectomy on feeding behaviour in pigs. *Applied Animal Ethology* 5:153.
- Baldwin, B. A. and C. De la Riva. 1995. Effects of the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT on operant feeding in pigs. *Physiology & Behavior* 58:611-613.
- Barb, C. R. 1999. The brain-pituitary-adipocyte axis: role of leptin in modulating neuroendocrine function. *J. Anim Sci.* 77:1249-1257.
- Barb, C. R., G. J. Hausman, and K. L. Houseknecht. 2001. Biology of leptin in the pig. *Domestic Animal Endocrinology* 21:297-317.
- Barb, C. R., A. S. Robertson, J. B. Barrett, R. R. Kraeling, and K. L. Houseknecht. 2004. The role of melanocortin-3 and -4 receptor in regulating appetite, energy homeostasis and neuroendocrine function in the pig. *J Endocrinol* 181:39-52.
- Barb, C. R., X. Yan, M. J. Azain, R. R. Kraeling, G. B. Rampacek, and T. G. Ramsay. 1998. Recombinant Porcine Leptin Reduces Feed Intake and Stimulates Growth Hormone Secretion in Swine. *Domestic Animal Endocrinology* 15:77-86.
- Barkeling, B., K. Elfhag, P. Rooth, and S. Rossner. 2003. Short-term effects of sibutramine (Reductil) on appetite and eating behaviour and the long-term therapeutic outcome. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders* 27:693-700.
- Barnes, N. M. and T. Sharp. 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083-1152.

- Batterham, R. L., M. A. Cowley, C. J. Small, H. Herzog, M. A. Cohen, C. L. Dakin, A. M. Wren, A. E. Brynes, M. J. Low, M. A. Ghatei, R. D. Cone, and S. R. Bloom. 2004. Physiology: Does gut hormone PYY3-36 decrease food intake in rodents? (reply). *Nature* 430.
- Batterham, R. L., M. A. Cowley, C. J. Small, H. Herzog, M. A. Cohen, C. L. Dakin, A. M. Wren, A. E. Brynes, M. J. Low, M. A. Ghatei, R. D. Cone, and S. R. Bloom. 2002. Gut hormone PYY3-36 physiologically inhibits food intake. *Nature* 418:650-654.
- Baxter, R. C. and J. L. Martin. 1986. Radioimmunoassay of growth hormone-dependent insulinlike growth factor binding protein in human plasma. *J. Clin. Invest.* 78:1504-1512.
- Berschauer, F. 1977. Die Blutharnstoffkonzentration als Parameter für die Proteinverwertung beim Schwein. Dissertation, Universität Hohenheim.
- Bjursell, M., E. Egecioglu, A. K. Gerdin, L. Svensson, J. Oscarsson, D. Morgan, M. Snaith, J. Törnell, and M. Bohlooly. 2005. Importance of melanin-concentrating hormone receptor for the acute effects of ghrelin. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 326:759-765.
- Bluet-Pajot, M. T., F. Presse, Z. Voko, C. Hoeger, F. Mounier, J. Epelbaum, and J. L. Nahon. 1995. Neuropeptide-E-I antagonizes the action of melanin-concentrating hormone on stress-induced release of adrenocorticotropin in the rat. *Journal of Neuroendocrinology* 7:297-303.
- Blundell, J. E. 1984. Serotonin and appetite. *Neuropharmacology* 23:1537-1551.
- Blundell, J. E., C. L. Lawton, and J. C. Halford. 1995. Serotonin, eating behavior, and fat intake. *Obes Res* 3:471S-476S.
- Bonavera, J. J., M. G. Dube, P. S. Kalra, and S. P. Kalra. 1994. Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide- Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 134:2367-2370.
- Borowsky, B., A. M. Durkin, K. Ogozalek, M. R. Marzabadi, J. DeLeon, R. Heurich, H. Lichtblau, Z. Shaposhnik, I. Daniewska, T. P. Blackburn, T. A. Branchek, C. Gerald, P. J. Vaysee, and C. Forray. 2002. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nature Medicine* 8:825-830.
- Bradford, M. M. V. and R. M. Gous. 1991. The response of growing pigs to a choice of diets differing in protein content. *Anim. Prod.* 52:185-192.
- Bray, G. A. and D. A. York. 1972. Studies on food intake of genetically obese rats. *Am J Physiol* 223:176-179.
- Bray, G. A. and D. A. York. 1979. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol. Rev.* 59:719-809.
- Brobeck, J. R., J. Teppermann, and C. N. H. Long. 1943. Experimental hypothalamic hyperphagia in the albino rat. *Yale J. Biol. Med.* 15:831-853.

- Brown, M., C. Bing, P. King, L. Pickavance, D. Heal, and J. Wilding. 2001. Sibutramine reduces feeding, body fat and improves insulin resistance in dietary-obese male Wistar rats independently of hypothalamic neuropeptide Y. *Br J Pharmacol* 132:1898-1904.
- Brumm, M. C. 1996. Effect of space allowance on barrow performance to 136 kilograms body weight. *NCR-89 Committee on Management of Swine. J. Anim Sci.* 74:745-749.
- Buffa, R., E. Solcia, and V. Go. 1976. Immunohistochemical identification of the cholecystokinin cell in the intestinal mucosa. *Gastroenterology* 70:528-532.
- Chambers, J., R. S. Ames, D. Bergsma, A. Muir, L. R. Fitzgerald, G. Hervieu, G. M. Dytko, J. J. Foley, J. Martin, W. S. Liu, J. Park, C. Ellis, S. Ganguly, S. Konchar, J. Cluderay, R. Leslie, S. Wilson, and H. M. Sarau. 1999. Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1. *Nature* 400:261-265.
- Claus, R., A. Bingel, S. Hofacker, and U. Weiler. 1990a. Twenty-four hour profiles of growth hormone (GH) concentrations in mature female and entire male domestic pigs in comparison with mature wild boars (*Sus scrofa* L.). *Livestock Production Science* 25:247-255.
- Claus, R., H.-D. Meyer, T. Gimenez, C. Hoang-Vu, and E. Munster. 1990b. Effect of seminal oestrogens of the boar on prostaglandin F2[alpha] release from the uterus of the sow. *Animal Reproduction Science* 23:145-156.
- Claus, R. and U. Weiler. 1987. Environmental influences on sex-dependent growth. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 15:301-316.
- Claus, R. and U. Weiler. 1994. Endocrine regulation of growth and metabolism in the pig: a review. *Livestock Production Science* 37:245-260.
- Claus, R. and U. Weiler. 1996. Relationships between IGF-I, cortisol, and osteocalcin in peripheral plasma of growing pigs. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 104:344-349.
- Claus, R., U. Weiler, S. Hofäcker, A. Herzog, and H. Meng. 1992. Cycle dependent changes of Growth Hormone (GH), Insulin-like Growth Factor (IGF-I) and Insulin in Bloodplasma of Sows and their relation to progesterone and oestradiol. *Growth Regulation* 1:115-121.
- Clegg, D. J., E. L. Air, S. C. Benoit, R. S. Sakai, R. J. Seeley, and S. C. Woods. 2003. Intraventricular melanin-concentrating hormone stimulates water intake independent of food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R494-R499.
- Connoley, I. P., Y. L. Liu, I. Frost, I. P. Reckless, D. J. Heal, and M. J. Stock. 1999. Thermogenic effects of sibutramine and its metabolites. *Br J Pharmacol* 126:1487-1495.
- Czaja, K., R. R. Kraeling, and C. R. Barb. 2003. Are hypothalamic neurons transsynaptically connected to porcine adipose tissue? *Biochemical & Biophysical Research Communications* 311:482-485.
- Ding, S. T., B. H. Liu, and Y. H. Ko. 2004. Cloning and expression of porcine adiponectin and adiponectin receptor 1 and 2 genes in pigs. *J. Anim Sci.* 82:3162-3174.

- Döcke, F. 1994. *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena; Stuttgart.
- DOCKRAY, G. J. 1976. Immunochemical evidence of cholecystokinin-like peptides in brain. *Nature* 264:568-570.
- Drazen, D. L., L. M. Coolen, A. D. Strader, M. D. Wortman, S. C. Woods, and R. J. Seeley. 2004. Differential Effects of Adrenalectomy on Melanin-Concentrating Hormone and Orexin A. *Endocrinology* 145:3404-3412.
- Dyer, C. J., K. J. Touchette, G. L. Allee, J. A. Carroll, and R. L. Matteri. 2000. Porcine agouti-related peptide: cloning, tissue distribution, and quantitation of size-related differences in gene expression. *J. Anim Sci.* 78:45.
- Ebenezer, I. S., C. De la Riva, and B. A. Baldwin. 1990. Effects of the CCK receptor antagonist MK-329 on food intake in pigs. *Physiology & Behavior* 47:145-148.
- Ebenezer, I. S., R. F. Parrott, and S. V. Vellucci. 1999a. Effects of the 5-HT_{1A} Receptor Agonist 8-OH-DPAT on Operant Food Intake in Food-Deprived Pigs. *Physiology & Behavior* 67:213-217.
- Ebenezer, I. S., R. F. Parrott, and S. V. Vellucci. 1999b. Pretreatment with 8-OH-DPAT or gepirone does not attenuate the depressant effect of CCK on operant food intake in pigs. *Br J Pharmacol* 126:258.
- Edwards, C. M., S. Abusnana, D. Sunter, K. G. Murphy, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 1999. The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol* 160:R7-12.
- Erspamer, V. and B. Asero. 1952. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169:800-801.
- Ettle, T. and F. X. Roth. 2004. Specific dietary selection for tryptophan by the piglet. *J. Anim Sci.* 82:1115-1121.
- Farooqi, I. S., G. S. H. Yeo, J. M. Keogh, S. Aminian, S. A. Jebb, G. Butler, T. Cheetham, and S. O'Rahilly. 2000. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J. Clin. Invest.* 106:271-279.
- Fernstrom, J. D. 1977. Effects of the diet on brain neurotransmitters. *Metabolism* 26:207-223.
- Filippatos, T. D., D. N. Kiortsis, E. N. Liberopoulos, D. P. Mikhailidis, and M. S. Elisaf. 2005. A review of the metabolic effects of sibutramine. *Current Medical Research and Opinion* 21:457-468.
- Fischer-Posovszky, P., H. Tornqvist, K. M. Debatin, and M. Wabitsch. 2004. Inhibition of Death-Receptor Mediated Apoptosis in Human Adipocytes by the Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I)/IGF-I Receptor Autocrine Circuit. *Endocrinology* 145:1849-1859.
- Forbes, J. M. 1995. *Voluntary Food Intake and Diet Selection in Farm Animals*. CAB International.

- Fuller, R. W. 1992. The involvement of serotonin in regulation of pituitary-adrenocortical function. *Frontiers in Neuroendocrinology* 13:250-270.
- Gilbertson, T. A., L. I. D. O. LIU, D. A. York, and G. A. Bray. 1998. Dietary Fat Preferences Are Inversely Correlated with Peripheral Gustatory Fatty Acid Sensitivity. *Ann NY Acad Sci* 855:165-168.
- Goerke, M. 2004. Erfassung der Auswirkungen des Appetitzüglers Sibutramin auf den Fettansatz beim Schwein. Bachelorarbeit, Universität Hohenheim, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie.
- Gregory, P. C., M. McFadyen, and D. V. Rayner. 1989. Relation between gastric emptying and short-term regulation of food intake in the pig. *Physiology & Behavior*. 45(4):677-83.
- Gregory, P. C., M. McFadyen, and D. V. Rayner. 1990. Pattern of gastric emptying in the pig: relation to feeding. *British Journal of Nutrition* 64:45-58.
- Gregory, P. C., M. McFadyen, and D. V. Rayner. 1995. Control of gastric emptying in the pig: influence of cholecystokinin, somatostatin and prokinetic agents. *Experimental Physiology*. 80(1):159-65.
- Groves, T. D. D. and A. J. J. Wood. 1965. Body composition studies on the suckling pig. II. The in-vivo determination of total body water. *Canadian journal of animal science* 45:14-21.
- Gundlach, C., K. F. Martin, D. J. Heal, and S. B. Auerbach. 1997. In Vivo Criteria To Differentiate Monoamine Reuptake Inhibitors from Releasing Agents: Sibutramine Is a Reuptake Inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 283:581-591.
- Hansen, D. L., S. Toubro, M. J. Stock, I. A. Macdonald, and A. Astrup. 1998. Thermogenic effects of sibutramine in humans. *Am J Clin Nutr* 68:1180-1186.
- Harvey, S., C. G. Scanes, and D. William. 1995. Growth hormone. CRC Press, Florida.
- Hauer, H., M. Meier, G. Wendland, T. Kurscheid, K. Lauterbach, and S.A.T. Study Group. 2004. Weight Reduction by Sibutramine in Obese Subjects in Primary Care Medicine: The S.A.T. Study. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 4:201-207.
- Heisler, L. K., M. A. Cowley, T. Kishi, L. H. Tecott, W. Fan, M. J. Low, J. L. Smart, M. Rubinstein, J. B. Tatro, J. M. Zigman, R. D. Cone, and J. K. Elmquist. 2003. Central serotonin and melanocortin pathways regulating energy homeostasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 994:169-74.:169-174.
- Hennig, A. and U. Ranft. 1995. Regulation der Futteraufnahme. In: H. Abel, G. Flachowsky, H. Jeroch, and S. Molnar (Eds.) *Nutztierernährung*. pp. 327-339. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Henry, Y., B. Seve, Y. Colleaux, P. Ganier, C. Saligaut, and P. Jegu. 1992. Interactive effects of dietary levels of tryptophan and protein on voluntary feed intake and growth performance in pigs, in relation to plasma free amino acids and hypothalamic serotonin. *J Anim Sci*. 70:1873-1887.

- Henry, Y., B. Seve, A. Mounier, and P. Ganier. 1996. Growth performance and brain neurotransmitters in pigs as affected by tryptophan, protein, and sex. *J. Anim Sci.* 74:2700-2710.
- Herpin, P., R. Bertin, J. Le Dividich, and R. Portet. 1987. Some regulatory aspects of thermogenesis in cold-exposed piglets. *Comparative Biochemistry & Physiology A-Comparative Physiology* 87:1073-1081.
- Hill, J., M. Duckworth, P. Murdock, G. Rennie, C. Sabido-David, R. S. Ames, P. Szekeres, S. Wilson, D. J. Bergsma, I. S. Gloger, D. S. Levy, J. K. Chambers, and A. I. Muir. 2001. Molecular Cloning and Functional Characterization of MCH2, a Novel Human MCH Receptor. *J. Biol. Chem.* 276:20125-20129.
- Hind, I. D., J. E. Mangham, S. P. Ghani, R. E. Haddock, C. J. Garratt, and R. W. Jones. 1999. Sibutramine pharmacokinetics in young and elderly healthy subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology* 54:847-849.
- Hoffmann, B., W. C. Wagner, and T. Gimenez. 1976. Free and conjugated steroids in maternal and fetal plasma in the cow near term. *Biol Reprod* 15:126-133.
- Houpt, T. R. 1983. The sites of action of cholecystokinin in decreasing meal size in pigs. *Physiology & Behavior* 31:693-698.
- Houpt, T. R. 1985. The physiological determination of meal size in pigs. *Proceedings of the Nutrition Society* 44:323-330.
- Houpt, T. R., S. M. Anika, and K. A. Houpt. 1979. Preabsorptive intestinal satiety controls of food intake in pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 236:R328-R337.
- Houseknecht, K. L., C. A. Baile, R. L. Matteri, and M. E. Spurlock. 1998. The biology of leptin: a review. *J. Anim Sci.* 76:1405-1420.
- Huonker, B. 2004. Charakterisierung von Wirkungen eines Serotonin-Agonisten (Wirkstoff: Sibutramin) mittels Cortisolbestimmung. Diplomarbeit, Universität Hohenheim, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie.
- Huszar, D., C. A. Lynch, V. Fairchild-Huntress, J. H. Dunmore, Q. Fang, L. R. Berkemeier, W. Gu, R. A. Kesterson, B. A. Boston, R. D. Cone, F. J. Smith, L. A. Campfield, P. Burn, and F. Lee. 1997. Targeted Disruption of the Melanocortin-4 Receptor Results in Obesity in Mice. *Cell* 88:131-141.
- Jackson, H. C., M. C. Bearham, L. J. Hutchins, S. E. Mazurkiewicz, A. M. Needham, and D. J. Heal. 1997. Investigation of the mechanisms underlying the hypophagic effects of the 5-HT and noradrenaline reuptake inhibitor, sibutramine, in the rat. *Br J Pharmacol* 121:1613-1618.
- Jackson, H. M. and D. W. Robinson. 1971. Evidence for hypothalamic alpha- and beta-adrenergic receptors involved in the control of food intake of the pig. *British veterinary journal* 127:Li-Liii.
- Jacobi, S. K., K. M. Ajuwon, T. E. Weber, J. L. Kuske, C. J. Dyer, and M. E. Spurlock. 2004. Cloning and expression of porcine adiponectin, and its relationship to adiposity, lipogenesis and the acute phase response. *J Endocrinol* 182:133-144.

- James, W. P., A. Astrup, N. Finer, J. Hilsted, P. Kopelman, S. Rossner, W. H. Saris, and L. F. Van Gaal. 2000. Effect of sibutramine on weight maintenance after weight loss: a randomised trial. STORM Study Group. Sibutramine Trial of Obesity Reduction and Maintenance. *Lancet*. 356(9248):2119-25, 356:2119-2125.
- Janning, T. 1993. Glukokortikoide als katabole Stoffwechselformone: Methodische Entwicklungen und Messungen beim Schwein. Universität Hohenheim, Institut für Tierhaltung und Leistungsphysiologie.
- Janowitz, H. D. and M. I. Grossman. 1949. Some factors affecting the food intake of normal dogs and dogs with esophagostomy and gastric fistula. *Am J Physiol* 159:143-148.
- Jezova, D., V. Bartanusz, I. Westergren, B. B. Johansson, J. Rivier, W. Vale, and C. Rivier. 1992. Rat melanin-concentrating hormone stimulates adrenocorticotropin secretion: evidence for a site of action in brain regions protected by the blood-brain barrier. *Endocrinology* 130:1024-1029.
- Kalra, S. P., M. G. Dube, S. Pu, B. Xu, T. L. Horvath, and P. S. Kalra. 1999. Interacting Appetite-Regulating Pathways in the Hypothalamic Regulation of Body Weight. *Endocr Rev* 20:68-100.
- Kawauchi, H., I. Kawazoe, M. Tsubokawa, M. Kishida, and B. I. Baker. 1983. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature* 305:321-323.
- Kennedy, A. R., J. F. Todd, W. S. Dhillon, L. J. Seal, M. A. Ghatei, C. P. Toole, M. Jones, D. Witty, K. Winborne, G. Riley, G. Hervieu, S. Wilson, and S. R. Bloom. 2003. Effect of Direct Injection of Melanin-Concentrating Hormone into the Paraventricular Nucleus: Further Evidence for a Stimulatory Role in the Adrenal Axis via SLC-1. *Journal of Neuroendocrinology* 15:268-272.
- Kennedy, A. R., J. F. Todd, S. A. Stanley, C. R. Abbott, C. J. Small, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 2001. Melanin-Concentrating Hormone (MCH) Suppresses Thyroid Stimulating Hormone (TSH) release, in Vivo and in Vitro, via the Hypothalamus and the Pituitary. *Endocrinology* 142:3265.
- Khalaf, F. 1969. Hyperphagia and Aphagia in swine with induced Hypothalamic lesions. *Res. Vet. Sci.* 10:514-517.
- Khalaf, F. and D. W. Robinson. 1972. Aphagia and Adipsia in Pigs with induced hypothalamic lesions. *Res. Vet. Sci.* 13:5-7.
- Kim, K. S., N. Larsen, T. Short, G. Plastow, and M. F. Rothschild. 2000. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth and feed intake traits. *Mammalian Genome* 11:131-135.
- Kirchgeßner, M. 1997. Tierernährung. Verlags Union Agrar.
- Klindt, J., F. C. Buonomo, and J. T. Yen. 1992. Administration of porcine somatotropin by sustained-release implant: growth and endocrine responses in genetically lean and obese barrows and gilts. *J. Anim Sci.* 70:3721-3733.

- Klindt, J., J. T. Yen, F. C. Buonomo, A. J. Roberts, and T. Wise. 1998. Growth, body composition, and endocrine responses to chronic administration of insulin-like growth factor I and(or) porcine growth hormone in pigs. *J. Anim Sci.* 76:2368-2381.
- Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, and K. Kangawa. 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660.
- Kym, P. R., R. Iyengar, A. J. Souers, J. K. Lynch, A. S. Judd, J. Gao, J. Freeman, M. Mulhern, G. Zhao, A. Vasudevan, D. Wodka, C. Blackburn, J. Brown, J. L. Che, C. Cullis, S. J. Lai, M. J. LaMarche, T. Marsilje, J. Roses, T. Sells, B. Geddes, E. Govek, M. Patane, D. Fry, B. D. Dayton, S. Brodjian, D. Falls, M. Brune, E. Bush, R. Shapiro, V. Knourek-Segel, T. Fey, C. McDowell, G. A. Reinhart, L. C. Preusser, K. Marsh, L. Hernandez, H. L. Sham, and C. A. Collins. 2005. Discovery and Characterization of Aminopiperidinecoumarin Melanin Concentrating Hormone Receptor 1 Antagonists. *J. Med. Chem.* 48:5888-5891.
- Kyriazakis, I., G. C. Emmans, and C. T. Whittemore. 1990. Diet selection in pigs: choices made by growing pigs given foods of different protein concentrations. *Anim. Prod.* 51:189-199.
- Langhans, W. 1999. Appetite regulation. In: G. E. Lobley, A. White, and J. C. MacRae (Eds.) *Protein metabolism and nutrition; Proceedings of the VIIIth Symposium on Protein Metabolism and Nutrition.* pp. 225-253. Wageningen.
- Lawrence, C. B., A. C. Snape, F. M. H. Baudoin, and S. M. Luckman. 2002. Acute Central Ghrelin and GH Secretagogues Induce Feeding and Activate Brain Appetite Centers. *Endocrinology* 143:155-162.
- LeBlanc, M. and L. Thibault. 2003. Effect of sibutramine on macronutrient selection in male and female rats. *Physiology & Behavior.* 80:243-252.
- Leibowitz, S. F. 1970. Reciprocal Hunger-Regulating Circuits Involving Alpha-and Beta-Adrenergic Receptor Located, Respectively, in the Ventromedial and Lateral Hypothalamus. *PNAS* 67:1063-1070.
- Leibowitz, S. F. 1971. Hypothalamic Alpha- and Beta-Adrenergic Systems Regulate Both Thirst and Hunger in the Rat. *PNAS* 68:332-334.
- Löffler, G. and P. E. Petrides. 2003. *Biochemie & Pathobiochemie.* Springer-Verlag.
- Lopes, S. O., R. Claus, M. Lacorn, A. Wagner, and R. Mosenthin. 2004. Effects of dexamethasone application in growing pigs on hormones, N-retention and other metabolic parameters. *Journal of Veterinary Medicine A* 51:97-105.
- Lord, E., S. Ledoux, B. D. Murphy, D. Beaudry, and M. F. Palin. 2005. Expression of adiponectin and its receptors in swine. *J. Anim Sci.* 83:565-578.
- Lotz, R. persönliche Mitteilung. 2005.
Ref Type: Personal Communication
- Ludwig, D. S., K. G. Mountjoy, J. B. Tatro, J. A. Gillette, R. C. Frederich, J. S. Flier, and E. Maratos-Flier. 1998. Melanin-concentrating hormone: a functional melanocortin antagonist in the hypothalamus. *American Journal of Physiology* 274:E627-E633.

- Marsh, D. J., K. Hollopeter, D. Huszar, R. Laufer, K. Yagaloff, S. L. Fisher, P. Burn, and R. D. Palmiter. 1999. Response of melanocortin-4-receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nature Genetic* 21:119-122.
- Mashiko, S., A. Ishihara, A. Gomori, R. Moriya, M. Ito, H. Iwaasa, M. Matsuda, Y. Feng, Z. Shen, D. J. Marsh, M. A. Bednarek, D. J. MacNeil, and A. Kanatani. 2005. Antiobesity Effect of a Melanin-Concentrating Hormone 1 Receptor Antagonist in Diet-Induced Obese Mice. *Endocrinology* 146:3080-3086.
- Mathews, L. S., G. Norstedt, and R. D. Palmiter. 1986. Regulation of Insulin-Like Growth Factor I Gene Expression by Growth Hormone. *PNAS* 83:9343-9347.
- Matteri, R. L., C. J. Dyer, K. J. Touchette, J. A. Carroll, and G. L. Allee. 2000. Porcine melanin-concentrating hormone (MCH): cDNA sequence, tissue distribution of mRNA, and effect of weaning and piglet size on hypothalamic gene expression. *J. Anim Sci.* 78:46.
- Mccann, U. D., J. Yuan, G. Hatzidimitriou, and G. A. Ricaurte. 1997. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Dissociate Fenfluramine's Anorectic and Neurotoxic Effects: Importance of Dose, Species and Drug. *J Pharmacol Exp Ther* 281:1487-1498.
- Meidtner, K., A. K. Wermter, J. Hebebrand, and R. Fries. 2005. Einfluss des Melanocortin-4-Rezeptors auf Wachstum und Fetteinlagerung in der F2 Generation einer Mangalitza x Piétrain Kreuzung. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde e. V. und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaft Kurzfassungen.
- Metz, C. 2003. Endokrine Reaktionen von Ebern auf die aktive Immunisierung gegen Gonadotropin-Releasing Hormon. Diss. Dr. med. vet., Universität Hohenheim, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie.
- Metz, C., K. Hohl, S. Waidelich, W. Drochner, and R. Claus. 2002. Active immunization of boars against GnRH at an early age: consequences for testicular function, boar taint accumulation and N-retention. *Livestock Production Science* 74:147-157.
- Meunier-Salaun, M. C., M. Monnier, Y. Colleaux, B. Seve, and Y. Henry. 1991. Impact of dietary tryptophan and behavioral type on behavior, plasma cortisol, and brain metabolites of young pigs. *J. Anim Sci.* 69:3689-3698.
- Morton, G. J., J. E. Blevins, D. L. Williams, K. D. Niswender, R. W. Gelling, C. J. Rhodes, D. G. Baskin, and M. W. Schwartz. 2005. Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals. *J. Clin. Invest.* 115:703-710.
- Münzer, T., S. M. Harman, P. Hees, E. Shapiro, C. Christmas, M. F. Bellantoni, T. E. Stevens, K. G. O'Connor, K. M. Pabst, C. St.Clair, J. D. Sorkin, and M. R. Blackman. 2001. Effects of GH and/or Sex Steroid Administration on Abdominal Subcutaneous and Visceral Fat in Healthy Aged Women and Men. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3604-3610.
- Murphy, K. G. and S. R. Bloom. 2004. Gut hormones in the control of appetite. *Exp Physiol* 89:507-516.
- Nammi, S., S. Koka, K. Chinnala, and K. Boini. 2004. Obesity: An overview on its current perspectives and treatment options. *Nutrition Journal* 3:3.

- Neary, N. M., A. P. Goldstone, and S. R. Bloom. 2004. Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clinical Endocrinology* 60:153-160.
- O'Connor, D., D. E. Clarke, D. Morrison, and A. P. Watt. 2002. Determination of drug concentrations in plasma by a highly automated, generic and flexible protein precipitation and liquid chromatography/tandem mass spectrometry method applicable to the drug discovery environment. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16:1065-1071.
- Owen, J. B. and W. J. Ridgman. 1968. Further studies of the effect of dietary energy content on the voluntary intake of pigs. *Animal Production* 10:85-91.
- Park, H. B., O. Carlborg, S. Marklund, and L. Andersson. 2002. Melanocortin-4 receptor (MC4R) genotypes have no major effect on fatness in a Large White&Wild Boar intercross. *Animal Genetics* 33:155-157.
- Parkes, D. G. 1996. Diuretic and natriuretic actions of melanin concentrating hormone in conscious sheep. *Journal of Neuroendocrinology* 8:57-63.
- Parrott, R. F. 1993. Peripheral and central effects of CCK receptor agonists on operant feeding in pigs. *Physiology & Behavior* 53:367-372.
- Parrott, R. F., R. P. Heavens, and B. A. Baldwin. 1986. Stimulation of feeding in the satiated pig by intracerebroventricular injection of neuropeptide Y. *Physiology & Behavior* 36:523-525.
- Pekas, J. C. and W. E. Trout. 1993. Cholecystokinin octapeptide immunization: effect on growth of barrows and gilts. *J. Anim Sci.* 71:2499-2505.
- Poeschla, B., J. Gibbs, K. J. Simansky, D. Greenberg, and G. P. Smith. 1993. Cholecystokinin-induced satiety depends on activation of 5-HT_{1C} receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 264:R62-R64.
- Presse, F., I. Sorokovsky, J.-P. Max, S. Nicolaidis, and J.-L. Nahon. 1996. Melanin-concentrating hormone is a potent anorectic peptide regulated by food-deprivation and glucopenia in the rat. *Neuroscience* 71:735-745.
- Prestle, J., A. Adomeit, E. Hammer, T. Ziehar, B. Missler, T. Appl, and M. Schindler. 2004. Cloning and functional characterization of porcine melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCH1-R). *Diabetologia* 47:A191.
- Qu, D., D. S. Ludwig, S. Gammeltoft, M. Piper, M. A. Pelleymounter, M. J. Cullen, W. F. Mathes, R. Przypek, R. Kanarek, and E. Maratos-Flier. 1996. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380:243-247.
- Rapport, M. M., A. A. Green, and I. H. Page. 1948. Serum vasoconstrictor (serotonin): IV. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 176:1243-1251.
- Reddy, G. P. V. 1994. Cell cycle: Regulatory events in G₁-->S transition of mammalian cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 54:379-386.

- Rindi, G., A. Torsello, V. Locatelli, and E. Solcia. 2004. Ghrelin Expression and Actions: A Novel Peptide for an Old Cell Type of the Diffuse Endocrine System. *Proc Soc Exp Biol Med* 229:1007-1016.
- Roesch, D. M. 2005. Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiology & Behavior* In Press, Corrected Proof.
- Rossi, M., S. J. Choi, D. O'Shea, T. Miyoshi, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 1997. Melanin-Concentrating Hormone Acutely Stimulates Feeding, But Chronic Administration Has No Effect on Body Weight. *Endocrinology* 138:351-355.
- Rossi, M., M. S. Kim, D. G. A. Morgan, C. J. Small, C. M. B. Edwards, D. Sunter, S. Abusnana, A. P. Goldstone, S. H. Russell, S. A. Stanley, D. M. Smith, K. Yagaloff, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 1998. A C-Terminal Fragment of Agouti-Related Protein Increases Feeding and Antagonizes the Effect of Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone in Vivo. *Endocrinology* 139:4428-4431.
- Ruckebusch, Y. 1991. Hormones of the adrenal cortex and medulla. In: Y. Ruckebusch, L. P. Phaneuf, and R. Dunlop (Eds.) *Physiology of small and large animals*. B.C. Decker Inc. Philadelphia Pennsylvania.
- Saito, Y., H. P. Nothacker, Z. Wang, S. H. S. Lin, F. Leslie, and O. Civelli. 1999. Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature* 400:265-269.
- Salfen, B. E., J. A. Carroll, and D. H. Keisler. 2003. Endocrine responses to short-term feed deprivation in weanling pigs. *J Endocrinol* 178:541-551.
- Salfen, B. E., J. A. Carroll, D. H. Keisler, and T. A. Strauch. 2004. Effects of exogenous ghrelin on feed intake, weight gain, behavior, and endocrine responses in weanling pigs. *J. Anim Sci.* 82:1957-1966.
- Scanes, C. G. 1995. Growth hormone action: agricultural significance. In: S. Harvey, C. G. Scanes, and W. H. Daughaday (Eds.) *Growth hormone*. pp. 451-475. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Scherer, P. E., S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini, and H. F. Lodish. 1995. A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270:26746-26749.
- Schwartz, G. J. 2000. The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition* 16:866-873.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, Jr., R. J. Seeley, and D. G. Baskin. 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671.
- Seoane, L. M., M. Lopez, S. Tovar, F. F. Casanueva, R. Senaris, and C. Dieguez. 2003. Agouti-Related Peptide, Neuropeptide Y, and Somatostatin-Producing Neurons Are Targets for Ghrelin Actions in the Rat Hypothalamus. *Endocrinology* 144:544-551.
- Shearman, L. P., R. E. Camacho, D. Sloan Stribling, D. Zhou, M. A. Bednarek, D. L. Hreniuk, S. D. Feighner, C. P. Tan, A. D. Howard, and L. H. T. Van der Ploeg. 2003. Chronic MCH-1 receptor modulation alters appetite, body weight and adiposity in rats. *European Journal of Pharmacology* 475:37-47.

- Souers, A. J., J. Gao, M. Brune, E. Bush, D. Wodka, A. Vasudevan, A. S. Judd, M. Mulhern, S. Brodjian, B. Dayton, R. Shapiro, L. E. Hernandez, K. C. Marsh, H. L. Sham, C. A. Collins, and P. R. Kym. 2005. Identification of 2-(4-Benzyloxyphenyl)-N-[1-(2-pyrrolidin-1-yl-ethyl)-1*H*-indazol-6-yl]acetamide, an Orally Efficacious Melanin-Concentrating Hormone Receptor 1 Antagonist for the Treatment of Obesity. *J. Med. Chem.* 48:1318-1321.
- Staiger, H. and H. U. Häring. 2005. Adipocytokines: Fat-derived humoral mediators of metabolic homeostasis. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 113:67-79.
- Stanley, B. G., S. E. Kyrkouli, S. Lampert, and S. F. Leibowitz. 1986. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: A powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 6:1189-1192.
- Stellar, E. 1954. The physiology of motivation. 1954. *Psychological Review* 61:5-22.
- Strack, A. M., J. Shu, R. Camacho, J. N. Gorski, B. Murphy, D. E. MacIntyre, and G. J. Hickey. 2002. Regulation of body weight and carcass composition by sibutramine in rats. *Obes Res* 10:173-181.
- Susenbeth, A. 1984. Berechnung der Körperzusammensetzung von Schweinen aus dem mit Hilfe von D2O bestimmten Körperwasser. Universität Hohenheim, Diss. sc. agr.
- Sze, P. Y., L. Neckers, and A. C. Towle. 1976. Glucocorticoids as a regulatory factor for Brain Tryptophan Hydroxylase. *Journal of Neurochemistry* 26:169-173.
- Takaya, K., H. Ariyasu, N. Kanamoto, H. Iwakura, A. Yoshimoto, M. Harada, K. Mori, Y. Komatsu, T. Usui, A. Shimatsu, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Kojima, K. Kangawa, and K. Nakao. 2000. Ghrelin Strongly Stimulates Growth Hormone Release in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4908-4911.
- Takekawa, S., A. Asami, Y. Ishihara, J. Terauchi, K. Kato, Y. Shimomura, M. Mori, H. Murakoshi, K. Kato, and N. Suzuki. 2002. T-226296: a novel, orally active and selective melanin-concentrating hormone receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology* 438:129-135.
- Talke, H. and G. E. Schubert. 1965. Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut und Serum im optischen Test nach Warburg. *Klin Wochenschr* 43:174-175.
- Tatemoto, K. 1982a. Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (8).
- Tatemoto, K. and V. Mutt. 1980. Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature* 285:417-418.
- Tatemoto, K. 1982b. Neuropeptide Y: Complete Amino Acid Sequence of the Brain Peptide. *PNAS* 79:5485-5489.
- Thompson, D. and A. M. Wolf. 2001. The medical-care cost burden of obesity. *Obesity Reviews* 2:189-197.

- Tissier, M., M. Theriez, A. Purroy, and F. Bocquier. 1983. Estimation in vivo de la composition corporelle de la brebis par la mesure de l'espace de diffusion de l'eau lourde. *Reproduction, Nutrition, Developpement* 23:693-707.
- Tritos, N. A., D. Vicent, J. Gillette, D. S. Ludwig, E. S. Flier, and E. Maratos-Flier. 1998. Functional interactions between melanin-concentrating hormone, neuropeptide Y, and anorectic neuropeptides in the rat hypothalamus. *Diabetes* 47:1687-1692.
- Tritos, N. A., G. Segal-Lieberman, P. S. Vezeridis, and E. Maratos-Flier. 2004. Estradiol-Induced Anorexia Is Independent of Leptin and Melanin-Concentrating Hormone. *Obes Res* 12:716-724.
- Tschop, M., T. R. Castaneda, H. G. Joost, C. Thone-Reineke, S. Ortmann, S. Klaus, M. M. Hagan, P. C. Chandler, K. D. Oswald, S. C. Benoit, R. J. Seeley, K. P. Kinzig, T. H. Moran, A. G. Beck-Sickinger, N. Koglin, R. J. Rodgers, J. E. Blundell, Y. Ishii, A. H. Beattie, P. Holch, D. B. Allison, K. Raun, K. Madsen, B. S. Wulff, C. E. Stidsen, M. Birringer, O. J. Kreuzer, M. Schindler, K. Arndt, K. Rudolf, M. Mark, X. Y. Deng, D. C. Withcomb, H. Halem, J. Taylor, J. Dong, R. Datta, M. Culler, S. Craney, D. Flora, D. Smiley, and M. L. Heiman. 2004. Physiology: Does gut hormone PYY3-36 decrease food intake in rodents? *Nature* 430.
- Unterman, T. G., R. M. Vazquez, A. J. Slas, P. A. Martyn, and L. S. Phillips. 1985. Nutrition and somatomedin. XIII. Usefulness of somatomedin-C in nutritional assessment. *The American Journal of Medicine* 78:228-234.
- van der Lely, A. J., M. Tschop, M. L. Heiman, and E. Ghigo. 2004. Biological, Physiological, Pathophysiological, and Pharmacological Aspects of Ghrelin. *Endocr Rev* 25:426-457.
- Weigle, D. S. 2003. Pharmacological Therapy of Obesity: Past, Present, and Future. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2462-2469.
- Williams, G., C. Bing, X. J. Cai, J. A. Harrold, P. J. King, and X. H. Liu. 2001. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: Different circuits, different purposes. *Physiology & Behavior* 74:683-701.
- Wood, A. J. and T. D. D. Groves. 1963. Changes in body composition of the pig during early growth based on deuterium oxide dilution techniques. *Ann NY Acad Sci* 110:349.
- Wurtman, R. J. and J. J. Wurtman. 1998. Serotonergic mechanisms and obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 9:511-515.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.
- Zhi, J., R. Moore, L. Kanitra, and T. E. Mulligan. 2002. Pharmacokinetic evaluation of the possible interaction between selected concomitant medications and orlistat at steady state in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 42:1011-1019.

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil R. Claus für die Überlassung des Themas und den Arbeitsmöglichkeiten am Fachgebiet für Tierhaltung und Leistungsphysiologie. Darüber hinaus möchte ich mich bei Ihm für seine stets gewährte Unterstützung und den wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen bedanken.

Der Fa. Boehringer Ingelheim, namentlich Herrn Dr. L. Thomas, Herrn Dr. M. Schindler und PD Dr. J. Zanzinger danke ich ganz herzlich für die Finanzierung des Projekts, der Bereitstellung der Wirkstoffe, ihrer Diskussionsbereitschaft und der Möglichkeit die Ergebnisse dieser Studie auch vor einem internationalen Publikum zu präsentieren. Herrn Dr. R. Lotz danke ich für die Messung der Sibutramin und Compound B4 Konzentrationen.

Mein weiterer Dank gilt Frau PD Dr. U. Weiler für die Einweisung und die Betreuung bei den radioimmunologischen Nachweisverfahren der Proteohormone und Ihren Tätigkeiten bei der Verlegung der Venenverweilkatheter.

Bei Herrn Dr. M. Lacorn bedanke ich mich für seine fachlichen Ratschläge und seine Betreuung der Messungen im Labor.

Ferner bedanke ich mich bei allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Fachgebiets für Tierhaltung und Leistungsphysiologie ohne deren Teamarbeit ein solches Projekt erst gar nicht durchführbar wäre.

Dankeschön an Frau B. Huonker und Frau M. Goerke deren Diplom- bzw. Bachelorarbeit im Rahmen dieses Projekts entstanden und damit Ihren Teil zum Gelingen beigetragen haben.

Herrn Dr. H. Steingäß und Frau TA Haller vom Institut für Tierernährung danke ich ganz herzlich für Ihre Einweisung und Betreuung bei der Messung der Proben zur Bestimmung des Körperfettgehalts.

Meiner Schwester danke ich von ganzem Herzen fürs Korrekturlesen, meiner Cousine Nicole und Ihren Freunden in London für die englischen Korrekturen und meiner Frau für Ihre Motivationsarbeit in zäheren Zeiten einer solchen Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vorname, Name: Torsten Sommer
Straße Nr.: Hofgut Uhenfels 4
Wohnort: 72574 Bad Urach
Geburtsdatum/-ort: 9. Mai 1974 in Ostfildern
Staatsangehörigkeit: deutsch

Berufliche Tätigkeit / Akademische Ausbildung/ Berufsausbildung

seit 08/2006 Mitarbeiter der Rinderunion Baden-Württemberg e.V. sowie selbstständiger Gesellschafter des Pferdepensionsbetriebes und des Veranstaltungsservices auf dem Hofgut Uhenfels

11/2005-07/2005 Produktmanager der Fa. Schaumann Agri International GmbH

6/2003-10/2005 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fachgebiet für Tierhaltung und Leistungsphysiologie der Universität Hohenheim. In dieser Zeit Erstellung der vorliegenden Dissertation

10/1998-06/2003 Studium der Allgemeinen Agrarwissenschaften, Fachrichtung Tierproduktion an der Universität Hohenheim.
Abschluss Dipl.-Ing. sc. agr.
Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Erzeugung eines Antiserums gegen das porcine Beta Defensin 1“

08/1994-07/1997 Besuch des agrarwissenschaftlichen Gymnasiums in Nürtingen mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife.

08/1990-06/1994 Berufsausbildung zum Kommunikationselektroniker bei der Firma Traub AG in Reichenbach/Fils mit anschließend fünfmonatiger Tätigkeit in der technischen Entwicklung.

08/1984-07/1990 Besuch der Realschule in Köngen mit Abschluss der mittleren Reife.

08/1980-07/1984 Besuch der Grundschule in Köngen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe. Es wurden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet.

Stuttgart-Hohenheim, den 8. Mai 2007

