

3 Material und Methoden

3.1 Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten männliche Wistarratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland; Stamm: Wistar). Ihr Durchschnittsgewicht betrug zu Versuchsbeginn ca. 200 – 250g.

3.2 Haltungsbedingungen

Damit sich die Tiere an die Umgebung des Tierstalls gewöhnen konnten, wurden sie mindestens 2 Wochen vor Versuchsbeginn vom Züchter bezogen. Zur Eingewöhnung wurden sie in Fünfer - Gruppen in Makrolon-Typ-IV-Käfigen gehalten. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einem vollklimatisierten Stall bei einer Umgebungstemperatur von 22 °C +/- 2° und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 %. Ein Lichtprogramm regelte in Zwölfstundenintervallen von jeweils 6.00 bis 18.00 Uhr den Tag–Nacht–Rhythmus.

2 Tage vor Versuchsbeginn wurden die Tiere zur Einzelhaltung in Makrolon-Typ-III- Käfige umgesetzt. Um den Isolationsstress zu minimieren, wurden alle Ratten im gleichen Raum mit Sicht-, Hör- und Geruchskontakt gehalten.

Die Ratten erhielten Altromin-1326-Standardfutter (Altromin, Lage, Deutschland) und Leitungswasser *ad libitum*.

3.3 Verwendete Substanzen und Applikationsart

Die verwendeten Substanzen und das Applikationsregime sind in Tab. 4 angegeben.

Tab. 4 Verwendete Substanzen und Applikationsart und -volumen

Substanzen	Hersteller	Zeitpunkt der Applikation (in Minuten vor Beginn der Dunkelphase)	Lösungsmittel	Applikationsart	Applikationsvolumen (ml/100g Ratte)
Camostat (FOY 305)	Medichem	15 / 120	NaCl 0,9%	Oral (p.o.)	1ml/100g
Devazepid (L365718)	MSD	30	NaCl 0,9% + 1 Tropfen Cremophor	intraperitoneal (i.p.)	0,1ml/100g
Sojabohnen – Trypsin – Inhibitor (STI)	ICN	15	NaCl 0,9%	p.o.	1ml/100g
D/L-Fenfluramin	Sigma	20	NaCl 0,9%	i.p.	0,1ml/100g

Die Substanzen wurden in 0,9%iger NaCl-Lösung jeweils vor Versuchsbeginn frisch gelöst. Alle Dosierungen beziehen sich auf die Körpermasse der Tiere (mg/kg oder µg/kg). Die Kontrollgruppen erhielten jeweils eine 0,9%ige Kochsalzlösung in entsprechender Menge und Applikationsweise.

Soybean Trypsin Inhibitor (STI) ist ein natürlicher Proteinaseinhibitor, der erstmals von Kunitz 1947 beschrieben wurde (Kunitz 1947 a/b). Es hemmt vor allem die proteolytische Aktivität von Trypsin, weniger die von Chymotrypsin und gar nicht die von Pepsin.

In unserem Fall verzögert es durch Blockade endogener Proteinase im Gastrointestinaltrakt den Abbau von Cholezystokinin und erhöht somit die endogene CCK-Konzentration am Rezeptor. Als Maßeinheit für die biologische Aktivität von STI gilt diejenige Menge des Trypsininhibitors die benötigt wird um eine bestimmte Einheit von Trypsin zu hemmen. Als Substrat der Trypsintätigkeit wird N- α - Benzoyl- L- Argininethylester (BAEE) bei einer Temperatur von 25°C und einem pH von 7,6 verwendet.

In der von uns verwendeten Charge hemmt 1mg STI 18,586 BAEE Trypsin.

Camostat mesylate (FOY 305) ist ein synthetisch hergestellter Proteinaseinhibitor, welcher sich für die orale und intravenöse Applikation eignet. Sein Hemmspektrum erstreckt sich vor allem auf Trypsin, Plasmin und Kallikrein. Außerdem hat es einen Einfluss auf die Aktivität von Thrombin und Plasmin.

Beide Proteinaseinhibitoren stimulieren die Freisetzung endogenem CCK durch Hemmung der duodenalen Proteasen (Goke et al. 1986, Green et al. 1986, McLaughlin et al. 1983, Sharara et al. 1993). Sie verzögern außerdem die Magenentleerung und vermindern die Nahrungsaufnahme über einen CCK-1-Rezeptor-abhängigen Mechanismus (Garlicki et al. 1990, McLaughlin et al. 1983, Varga und Scaripagnato 1996).

Devazepid ist ein Benzodiazepin, welches als selektiver Antagonist am CCK-1-Rezeptor wirkt. Es antagonisiert die Effekte von exogenem (Dourish et al., 1989a/b) und endogenem CCK und induziert eine vermehrte Futteraufnahme in Ratten und Schweinen (Dourish et al., 1988; Hewson et al., 1988). Es kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden.

Fenfluramin ist ein indirekter Agonist am 5-HT-Rezeptor und wirkt indem es die Freisetzung von 5-HT stimuliert und die Wiederaufnahme in die präsynaptischen Nervenendigungen hemmt. Erhöhte Serotoninkonzentrationen führen zu einer Reduzierung der Mahlzeitgröße und Verminderung der Mahlzeithäufigkeit in verschiedenen Spezies einschließlich des Menschen.

3.4 Durchführung und Experimente

Alle Fütterungsversuche wurden an nicht futterdeprivierten Ratten mit Beginn der Dunkelphase vorgenommen. Zwischen Substanzapplikation und Beginn der Dunkelphase waren die Tiere ca. 15 Minuten ohne Nahrung. Die vorher eingewogenen Pellets bekam jedes Tier zu Beginn der Dunkelphase.

Nach Substanzapplikation und anschließender Futtergabe zu Beginn der Dunkelphase erfolgten Messungen des Futtermittelsverbrauchs in Abhängigkeit von der untersuchten Substanz und dem Versuchsdesign 1, 2, 4 und 24 Stunden nach Futtergabe. Zur Messung diente eine elektronische Waage (Mettler TOLEDO SB 12001) mit einer Messgenauigkeit von $\pm 0,05\text{g}$.

Mit der gleichen Waage wurde auch der Wasserverbrauch der Ratten gemessen. Zu Versuchsbeginn wurde die Wassermenge der einzelnen Reservoirs in Gramm gemessen. Eine zweite Messung erfolgte 24 Stunden später nach Versuchsende. Die Differenz wurde als Wasserverbrauch in Gramm verwendet.

In gleicher Weise wurde das Körpergewicht der Ratten ebenfalls zu Versuchsbeginn und nach 24 Stunden zu Versuchsende bestimmt.

3.5 Versuchsgruppen

Alle Versuchsgruppen bestanden jeweils aus $n = 10$ Ratten. Die Ratten wurden nur einmalig zu einem Versuch eingesetzt. Alle experimentellen Gruppen und alle Experimente waren folglich unabhängig voneinander.

Da zur Wirkung von STI und Camostat auf die Nahrungsaufnahme bisher keine eigenen Befunde vorlagen, wurde in Pilotexperimenten der Zeitpunkt der maximalen Wirkung für STI (1 Stunde nach Futtergabe) und Camostat (4 Stunden nach Futtergabe) bestimmt. Diese beiden Zeitpunkte wurden anschließend in den Kombinationsuntersuchungen berücksichtigt.

3.6 Substanzen, deren Effekte auf die Nahrungsaufnahme über CCK vermittelt werden

a. Camostat

Den Ratten wurde jeweils 50, 100 oder 200mg/kg des Proteinaseinhibitors Camostat appliziert. Der Futterverbrauch wurde 4 und 24 Stunden nach Futtergabe bestimmt.

b. Sojabohnen Trypsin Inhibitor

STI wurde in Dosierungen von 125, 250 und 500mg/kg appliziert. Der Futterverbrauch wurde 1 und 24 Stunden nach Futtergabe bestimmt.

c. Devazepid

Durch Kombination von Camostat mit dem CCK1-Rezeptorantagonisten Devazepid sollte bestätigt werden, dass die hypophagische Wirkung des Proteinaseinhibitors über den CCK1-Rezeptor vermittelt wird. Die gewählten Einzeldosierungen von Devazepid betragen 10, 30 und 100µg/kg. Der Kombinationsversuch erfolgte mit 200mg/kg Camostat und 100µg/kg Devazepid. Der Futterverbrauch wurde nach 4 und 24 Stunden bestimmt.

3.7 Substanzen, deren Effekte auf die Nahrungsaufnahme über das serotonerge System vermittelt werden

Fenfluramin

Die Substanz wurde in Dosierungen von 0,3, 1, 3 und 9mg/kg verabreicht. Der Futterverbrauch wurde 1, 4 und 24 Stunden nach Futtergabe bestimmt.

3.8 Kombinationsversuche

In diesen Versuchen wurden die Ratten mit jeweils zwei unterschiedlichen Substanzen behandelt. Je nach Kombinations- und Applikationsart wurden die Pharmaka unter Berücksichtigung der substanztypischen Vorbehandlungszeit appliziert.

a. Camostat und Fenfluramin

Die Ratten erhielten in den Kombinationsversuchen eine Dosis von 200mg/kg Camostat oral und eine Dosis von 1mg/kg bzw. 3mg/kg Fenfluramin i.p. 15 bzw. 20 Minuten vor Beginn der Dunkelphase. Entsprechend des vorangegangenen Versuchs mit Camostat wurde der Futterverbrauch 4 Stunden nach Futtergabe bestimmt.

Aufgrund des unterschiedlichen Zeitpunkts der höchsten Wirksamkeit von Camostat und Fenfluramin (von Fenfluramin 2 Stunden und von Camostat 4 Stunden nach erster Substanzapplikation) wurde in einem weiteren Versuch die Vorbehandlungszeit für Camostat um 2 Stunden verlängert. Die Tiere erhielten 200mg/kg Camostat 2 Stunden vor Beginn der Dunkelphase, während Fenfluramin wie gewohnt 20 Minuten vor Beginn der Dunkelphase verabreicht wurde. Die mit Camostat behandelten Ratten hatten während der 2 Stunden vor Versuchbeginn keinen Zugang zu Nahrung und waren somit kurzfristig futterdepriviert. Die Kombination erfolgte wie vorher mit 200mg/kg Camostat und 1mg/kg bzw. 3mg/kg Fenfluramin.

b. STI und Fenfluramin

Eine Dosis von 1mg/kg und eine Dosis von 3mg/kg Fenfluramin wurden jeweils mit 500mg/kg STI kombiniert und der Futterverbrauch 1 Stunde nach Futtergabe gemessen.

3.9 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt vom Dunnett's Multiple Comparison Test (Einzelversuche) oder Bonferroni's Multiple Comparison Test (Kombinationsversuche). Eine Wahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ galt als signifikant.

Die Durchführung der in dieser Arbeit dargestellten Tierversuche wurde nach § 9 Absatz 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland unter der Nr. G 0352 am 25.05.1998 genehmigt.