

6. ERGEBNISSE

6.1 Nichtinvasive Erhebungen

6.1.1 Reaktion des Gaswechsels auf unterschiedlich umsetzbare Energie im Futter

6.1.1.1 Sauerstoffverbrauch

Der Sauerstoffverbrauch in der Ruhephase zwischen 00.00 und 06.00 Uhr, in der Abb.2 als basaler Sauerstoffverbrauch bezeichnet, war zwischen der Gruppe, die Futter mit einer umsetzbaren Energie 2-fach des Erhaltungsbedarfs erhielt (Abb.2, 2.0-MEm), um 1,9 L/10min (22%) höher als der Verbrauch in der Gruppe, die mit dem Futter eine umsetzbare Energie 1,5-fach des Erhaltungsbedarfs aufnahm (Abb.2, 1,5-MEm). Diese signifikante ($P = 0,02$) Differenz verringerte sich auf 1,7 und 1,6 L/10min in der Futteraufnahmeperiode am Morgen und am Nachmittag (Abb.2), doch blieb sie statistisch signifikant ($P = 0,04$). Die Gaswechsellmessungen wurden an unbehandelten Versuchstieren für weitere zwei Tage durchgeführt, um zu ermitteln, ob ein längerer Aufenthalt in der Respirationkammer einen Einfluss auf die oxidative Stoffwechselintensität ausübt. Der am dritten Tag auftretende schwache Abfall im Sauerstoffverbrauch war statistisch nicht signifikant. Deshalb wurde angenommen, dass ein Aufenthalt für drei Tage in der Respirationkammer zu keiner deutlichen Beeinflussung der experimentell zu prüfenden physiologischen Reaktionen führt.

6.1.1.2 CO₂-Produktion

Die basale CO₂-Produktion (Abb.3) der 2.0-MEm-Gruppe betrug 1L/min und war damit um 27% höher ($P = 0,04$) als die basale CO₂-Produktion in der 1,5-MEm-Gruppe. Im Gegensatz zum O₂-Verbrauch stieg die Differenz zwischen beiden Gruppen von 0,21 L/min auf 0,26 L/min ($P = 0,01$) nach der morgendlichen Futteraufnahme, verringerte sich aber in der Periode der Futteraufnahme am Nachmittag (Abb.3). Über die Tage hinweg gesehen waren die CO₂-Produktionswerte in der Ruhephase und in Reaktion auf die Futteraufnahme am Nachmittag in beiden Gruppen praktisch gleich. Die Tendenz einer höheren CO₂-Produktion, über die drei Tage gesehen, in Reaktion auf die Futteraufnahme am Morgen war statistisch nicht signifikant.

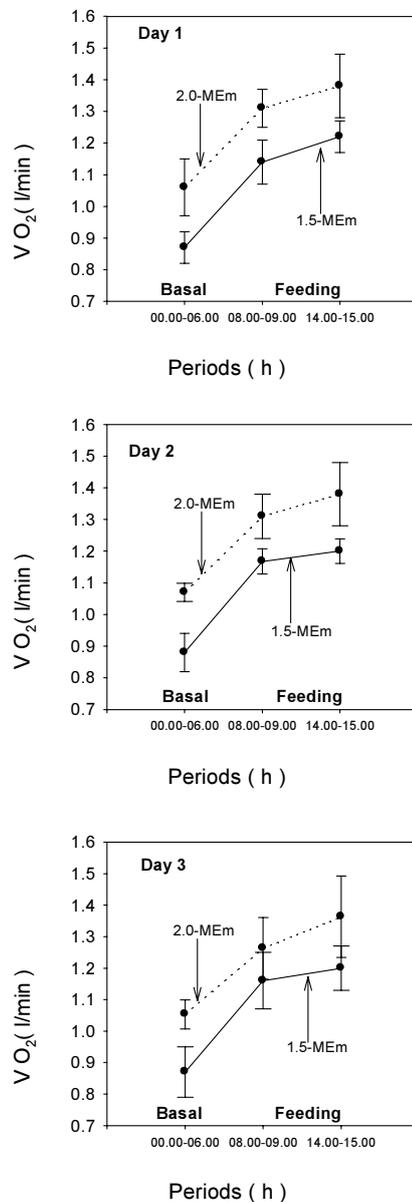
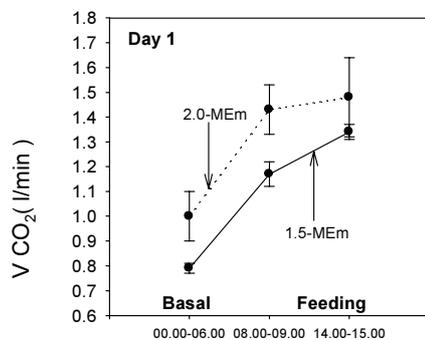
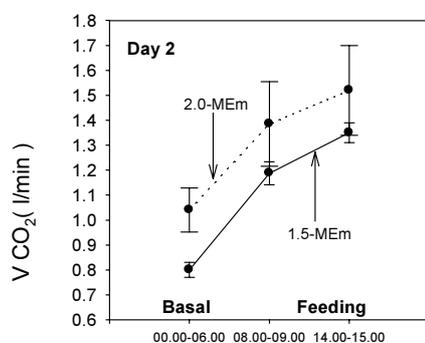


Abb.2 Basaler und Futteraufnahmeinduzierter O_2 -Verbrauch

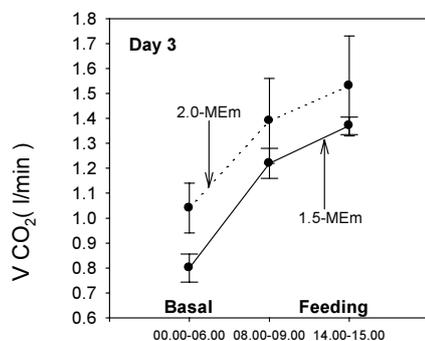
Zwei Gruppen mit je 4 Jungbullen erhielten umsetzbare Energie 1,5- und 2,0fach des Erhaltungsbedarfes (1,5-MEm und 2,0-MEm). Der O_2 -Verbrauch wurde in Respirationskammern gemessen. Die Kleinst-Quadrat-Mittelwerte \pm SD einer basalen Phase während der Nüchternung über Nacht (00.00-06.00 Uhr), während der Futteraufnahme (feeding) am Morgen (08.00-09.00 Uhr) und am Nachmittag (14.00-15.00 Uhr) sind dargestellt. Die Daten wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen erhoben, um die Wiederholbarkeit der Messungen zu prüfen. Signifikante Differenzen zwischen den Tagen traten nicht auf, während sich die Diätgruppen signifikant unterschieden.



Periods (h)



Periods (h)



Periods (h)

Abb.3 Basale und Futteraufnahmeinduzierte CO₂-Produktion

Die Vorgehensweise und die Symbole sind in der Abb.2 beschrieben. Messungen an drei aufeinanderfolgenden Tagen dienen der Überprüfung der Wiederholbarkeit. Die CO₂-Produktion während der Nüchternungsphase über Nacht (00.00-06.00 Uhr), als basale Phase ausgewiesen, war an den drei Tagen praktisch identisch. In dieser Phase unterschieden sich die Diätgruppen signifikant.

6.1.1.3 CH₄-Produktion

Methan wird durch anaerobe, fermentative Prozesse erzeugt, dabei wird die Gesamtmethanproduktion von den mikrobiellen Umsetzungen im Pansen bestimmt. Die Basiswerte (Abb. 4) betragen 0,58 L/10min und 0,38 L/10min ($P = 0,03$) in den Gruppen mit einer umsetzbaren Energie im Futter 2,0- und 1,5-fach des Erhaltungsbedarfes (in der Abb. 4 wiederum als 2,0-MEm und 1,5-MEm ausgewiesen). Die Differenz zwischen den Gruppen stieg von 0,2 L/10min auf 0,35 L/10min durch die Futteraufnahme am Morgen an. Der Methanproduktionswert während der morgendlichen Futteraufnahme verdoppelte sich relativ zum Basalwert in der 2,0-MEm-Gruppe, stieg aber nur um 46% des Basalwertes in der 1,5-MEm-Gruppe. Dadurch erhöhte sich die Differenz zwischen den Gruppen auf 0,35 L/10min ($P < 0,01$). Diese Ergebnisse zeigen, dass die 2,0-MEm-Diät zu einer signifikant höheren Aufnahme an umsetzbarer Energie für die Fermentation führte. Sie zeigen aber auch eine Sättigung der anaeroben Abläufe des Pansens in der 2,0-MEm-Gruppe, da der Anstieg in der Methanproduktion bei der Nachmittagsfütterung in dieser Gruppe im Gegensatz zu der 1,5-MEm-Gruppe (Abb. 4) nicht mehr signifikant war. Die 2,0-MEm-Diät kann deshalb auch als Aufnahme an Futterenergie ad libitum, die der 1,5-MEm-Diät als restriktiv bezeichnet werden. Die Aufnahme ad libitum führt zu einer deutlich höheren Umwandlung in eine Energieform (Methan), die nicht in körpereigene Energie assimilierbar ist. Ein deutlicher Einfluss der Dauer des Aufenthalts in der Respirationsskammer war nicht nachweisbar.

6.1.1.4 Thermogenese

Die Daten aus den Messungen des Sauerstoffverbrauches, der CO₂- und Methanproduktion zeigen, dass die Versuchstiere der 1,5-MEm-Diät-Gruppe während der Zeitspanne 00.00-06.00 Uhr eine Nüchternungsphase durchlaufen haben, die hinsichtlich der Verdauungsvorgänge auch als Ruhephase angesehen werden kann. In der Tendenz gilt das auch für die 2,0-MEm-Diät-Gruppe. Damit nähert sich der Stoffwechsel in der Ruhephase einem oxidativen Grundumsatz. Die Berechnung dieses Umsatzes über Gaswechsellmessungen erfordert eine Annäherung an Fließgleichgewichtsbedingungen, und die Ruhephase nähert sich ihnen an. Dann gelten die Voraussetzungen für die Verwendung von Koeffizienten α , die den Sauerstoffverbrauch, CO₂- und Methanproduktion aufgrund der Aktivität der zugehörigen intrazellulären biochemischen

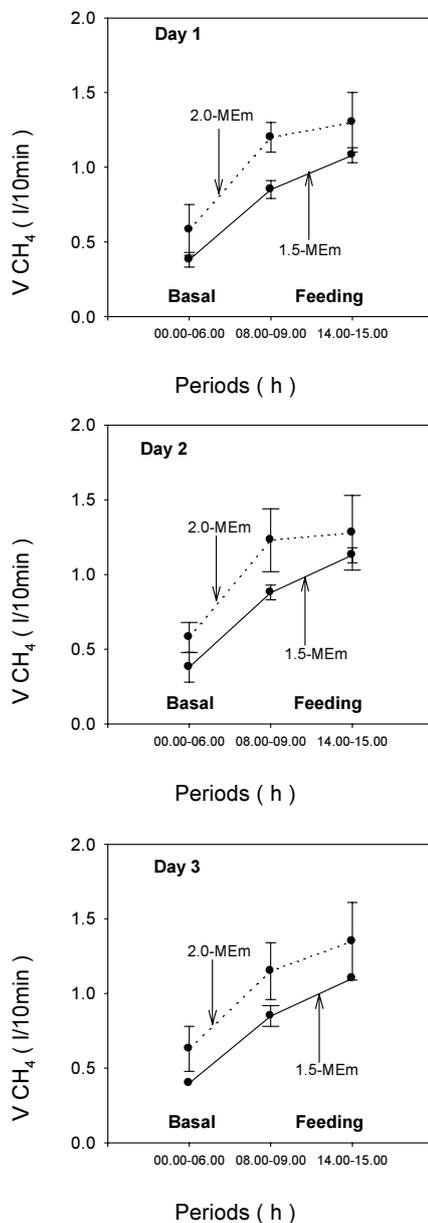


Abb.4 Basale und Futteraufnahmeinduzierte CH₄-Produktion

Die CH₄-Produktion von Jungbullern (4 je Gruppe), die 1,5- und 2,0-fach des Erhaltungsbedarfes an umsetzbarer Energie erhielten (1,5-MEm und 2,0-MEm), wurde in Respirationsskammern an drei aufeinanderfolgenden Tagen gemessen. Als basale CH₄-Produktion wurde die Nüchternungsphase über Nacht (00.00-06.00 Uhr) angesehen. Die Futteraufnahmeinduzierte CH₄-Produktion wurde zwischen 08.00-09.00 und 14.00-15.00 Uhr erfasst. Die Symbole bedeuten Kleinste-Quadrat-Mittelwerte \pm SD in diesen Zeitspannen. Die basale CH₄-Produktion unterschied sich nicht wesentlich zwischen den Tagen. Die Reaktionen auf die Futteraufnahme sind im Text kommentiert.

Stoffwechselwege wichten, einschließlich der hier verwendeten Koeffizienten für Rinder. Die mit oxidativen Umsetzungen entstehende Thermogenese während Aktivitätsphasen, seien es Verdauungsvorgänge oder Bewegungen, stehen mit diesem oxidativen Grundumsatz, der Wärmeproduktion, in einer nichtlinearen Beziehung (Treuth et al. 1998).

Die Produktion von CO₂ und Methan sowie des Sauerstoffverbrauchs in Phasen der Futteraufnahme und in der Ruhephase (Abb. 2-4) stimmen gut mit den an anderen Tierarten oder dem Menschen gefundenen nichtlinearen Beziehungen (Treuth et al. 1998) überein. Folglich kann die Wärmeproduktion in ihrer Definition als Maß für den oxidativen Umsatz der innerhalb von Zellen vorliegenden Substrate (die aus dem Futter oder körpereigenen Mobilisierungen stammen können) nur für die in der Nüchternungsphase erhaltenen Werte der Gaswechsellmessungen (Basalwerte) unter Verwendung konstanter Wichtungskoeffizienten, wie sie publiziert worden sind (Brouwer 1965), berechnet werden. In der Abb. 5 nähern sich deshalb die Basalwerte der Wärmeproduktion an. Sie unterscheiden sich zwischen den Diätgruppen um 11% (P=0,04). Dagegen treten keine signifikanten Differenzen bei futteraufnahmeinduzierter Thermogenese auf.

Die mit der Aufnahme von umsetzbarer Energie ad libitum absorbierten, assimilierbaren (den Körperzellen zur Verfügung stehenden), offenbar überschüssigen Metabolite werden damit einen Zwang zur differenzierten Regulation, getrennt nach futteraufnahmeinduzierter Thermogenese und Wärmeproduktion, hervorrufen. Bekannt ist, dass die Anlieferung von Blutmetaboliten mit Erhöhung der Aufnahme an umsetzbarer Energie hauptsächlich durch einen intensiveren Blutfluss vermittelt wird. So steigt der portale, den Darmtrakt drainierende Blutfluß proportional mit der Aufnahme an umsetzbarer Energie an, während unklare Befunde darüber vorliegen, ob die Blutflussänderung auch die Extremitäten betrifft (Ortigue et al. 1995). Durch Direktmessungen war weiterhin zu klären, ob die Blutflussregulation in die unterschiedliche Regulation von Wärmeproduktion und futteraufnahmeinduzierter Thermogenese einbezogen ist.

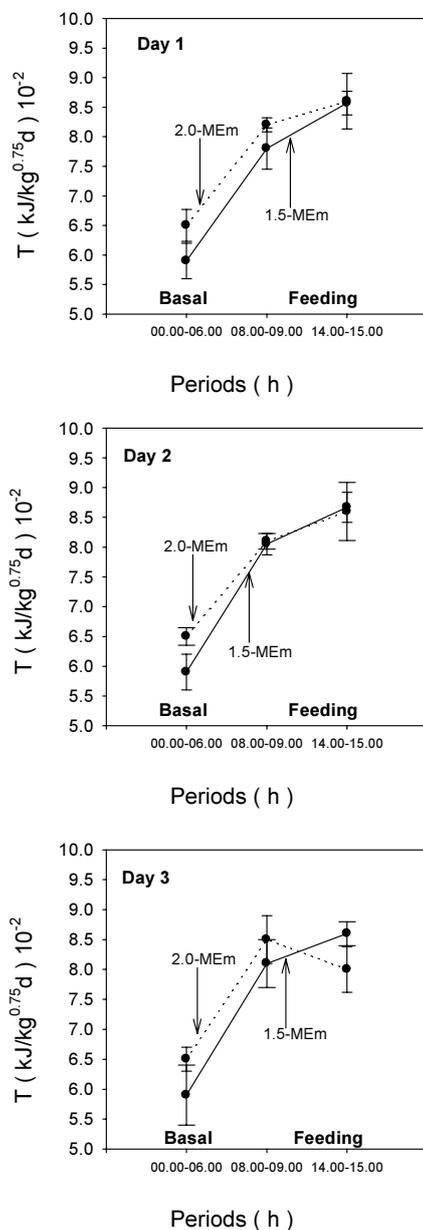


Abb.5 Basale und Futteraufnahmeinduzierte Thermogenese (T)

Die Gaswechseldaten, die im einzelnen in den Abb.2-4 dargestellt sind, waren die Grundlage zur Berechnung der thermogenen Aktivität von Jungbullen, die 1,5- und 2,0-fach des Erhaltungsbedarfs an umsetzbarer Energie erhielten (1,5-MEm und 2,0-MEm, 4 Versuchstiere je Gruppe). Die Gruppen unterscheiden sich signifikant in der basalen Phase (Nüchternungszeit zwischen 00.00-06.00 Uhr). Die Daten dieser Phase nähern sich der basalen Wärmeproduktion an. Sie sind, an drei aufeinanderfolgenden Tagen gemessen, wiederholbar. Die durch eine Futteraufnahme induzierte Thermogenese (Gesamtwärmeproduktion) unterscheidet sich nicht zwischen den Diätgruppen.

6.1.1.5 Respirationsquotient

Ein zeitlicher Vergleich für das Verhältnis zwischen CO₂-Produktion und Sauerstoffverbrauch (Respirationsquotient, RQ) gibt Hinweise auf das hauptsächlich oxidierte Substrat. Da Kohlenhydrate einen höheren Sauerstoffgehalt als Lipide haben, geht RQ gegen 1 bei vorrangiger Kohlenhydratoxidation und gegen 0,7 bei vorrangiger Oxidation von längerkettigen Fettsäuren. Dem gegenüber steigt RQ>1 bei der körpereigenen Synthese längerkettiger Fettsäuren. Bei Erfassung des Harnstickstoffs kann weiterhin Auskunft über den Anteil der Oxidation von Proteinbestandteilen (RQ=0,81) erhalten werden. Die Möglichkeit der Gewinnung dieser Informationen impliziert, dass der zeitliche Verlauf der RQ-Werte (neben den Einzelgasmessergebnissen) über eine Annäherung an eine Ruhephase informiert. Diese Ruhe- oder Basalphase stimmt bei Messungen in Respirationskammern im wesentlichen mit dem Nüchterungsverlauf überein, wie den vorangegangenen Abschnitten zu entnehmen ist. In der Abb. 6 wird gezeigt, dass in der Zeitspanne zwischen 00.00 und 06.00 Uhr RQ der 1,5-MEM-Gruppe gegen 0,7, RQ der 2,0-MEM-Gruppe gegen 0,8 (P<0,01) ging. Dagegen stieg RQ auf annähernd 1 in beiden Gruppen während der Futteraufnahmeperiode (Abb. 6). In dieser Zeit werden folglich vorrangig Kohlenhydrate oder kurzkettige (flüchtige) Fettsäuren, wahrscheinlich vor allem Acetat und Propionat (Remond et al. 1995) mit einem ähnlichen molaren O/C-Anteil wie Kohlenhydrate, oxidiert. Während die 2,0-MEM-Gruppe in der Ruhephase sich einer Nüchterung annähert, wird ein Nüchterungszustand bei der 1,5-MEM-Gruppe klar erreicht. Er ist vorrangig durch Mobilisierung und Oxidation von längerkettigen Fettsäuren charakterisiert. Dadurch sinkt RQ auf den in der Abb. 6 ausgewiesenen Wert von 0,75.

6.1.2 Herzfrequenz

6.1.2.1 Reaktion auf die Futteraufnahme

Eine Futteraufnahme ist mit einer Umverteilung des Blutes in Richtung der Verdauungsorgane verbunden (Eisenmann et al. 1990). Das schließt ein, dass die Herzaktivität in dieser Phase ansteigt. Nach den in der Abb. 7 dargestellten Ergebnissen reagiert die Herzfrequenz beim Rind sofort auf die Aufnahme von Futter mit einer beträchtlichen Erhöhung um 40±9 Schläge/min in der 1,5-MEM-Gruppe und um 55±10 Schläge/min in der 2,0-MEM-Gruppe. Damit steigt sie signifikant (P<0,01) gegenüber der

Basalfrequenz an, die bei der 1,5-MEm-Gruppe 60 ± 5 und bei der 2,0-MEm-Gruppe 71 ± 8 /min beträgt.

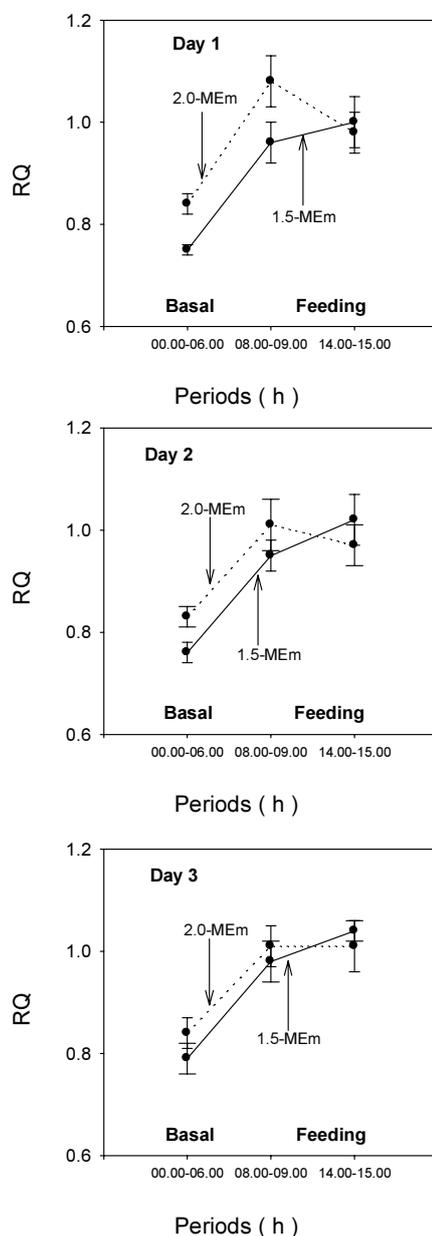


Abb.6 Basaler und futteraufnahmeinduzierter Respirationsquotient

Der Respirationsquotient (RQ) wurde aus den Daten, die in den Abb.2-3 dargestellt sind, berechnet. In diesen Abbildungen sind auch die vorliegend verwendeten Symbole erklärt. Signifikante Unterschiede zwischen den Messergebnissen an drei aufeinanderfolgenden Tagen waren in der basalen Phase (Nüchterung zwischen 0.00-06.00 Uhr) und in Reaktion auf die Futteraufnahme (Fütterung am Morgen, 08.00-09.00 Uhr, am Nachmittag, 14.00-15.00 Uhr) nicht nachweisbar. Allerdings war eine Tendenz zur Verringerung der signifikanten Differenz zwischen den Diätgruppen während der basalen Phase und der Reaktion auf die Morgenfutteraufnahme zu beobachten.

Der Anstieg in der Herzfrequenz klingt nach Aufnahme des Futters ab (etwa nach 30min) und nähert sich dem Ausgangswert im Verlauf von etwa 2h nach Fütterung am Morgen (Abb. 7). Diese Reaktion weist darauf hin, dass nicht der Verdauungsvorgang, sondern die Futteraufnahme einen Impuls für den Anstieg der Herzfrequenz liefert. Die länger anhaltende Abklingphase nach der Fütterung am Nachmittag kann jedoch mit Verdauungsabläufen zusammenhängen.

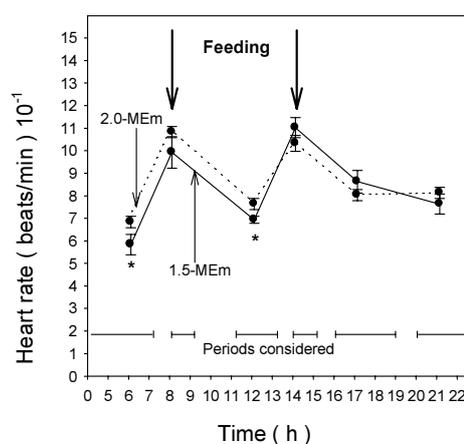


Abb.7 Basale und futteraufnahmeinduzierte Herzfrequenz

Die Ergebnisse der Herzfrequenzmessungen sind als Kleinste-Quadrat-Mittelwerte \pm SEM in den Zeitspannen, die über der Abszisse markiert sind, dargestellt. Den Beginn der Futteraufnahme (feeding) zeigen Pfeile an. Die Sternchen weisen auf signifikante Differenzen zwischen den Gruppen hin, die 1,5- und 2,0-fach des Erhaltungsbedarfes an umsetzbarer Energie erhielten (1,5-MEM und 2,0-MEM, 4 Jungbullen je Gruppe), d.h., nur die Herzfrequenz in der Nüchterungsphase über Nacht und vor der Nachmittagsfütterung war bei der 2,0-MEM-Gruppe signifikant höher als die der 1,5-MEM-Gruppe. Damit reagieren die basale Herzfrequenz und die basale Thermogenese (Abb.5) ähnlich auf eine intensive Ernährung mit umsetzbarer Energie.

6.1.2.2 Reaktion auf die Aktivierung von K_{ATP}-Kanälen

Zur Prüfung der Wirkung einer Aktivierung von K_{ATP}-Kanälen auf die Herzfrequenz wurde Levromakalim nach der Nüchterung über Nacht (17h) verabreicht. Die Reaktion der Herzfrequenz auf Levromakalim wurde in der Nüchternphase und nach den Futteraufnahmen verfolgt. In der Nüchternphase erhöhte Levromakalim (80 nMol/kg) die Herzfrequenz deutlich ($P=0,01$) bis 20 min nach der Infusion sowohl in der Gruppe mit einer oxidativen Stoffwechselintensität von 601 kJ/kg^{0,75}d als auch in der Gruppe mit einer Intensität von 656 kJ/kg^{0,75}d. Diese Gruppen sind in der Abb. 8 mit MR-601 und MR-656

bezeichnet worden. Zur Überprüfung der Spezifität der Reaktion wurde in der MR-656-Gruppe ermittelt, ob es sich um einen dosisabhängigen Effekt handelt und ob die Reaktion durch einen K_{ATP} -Kanal-Inhibitor verringert oder aufgehoben wird. Die Herzfrequenz reagierte auf eine Levromakaliminfusion in einer Dosis von 240 nMol/kg erheblich ($P=0,02$) stärker bis 20 min nach der Infusion (Abb. 8). Eine Vorbehandlung mit Glibenclamid (480 nMol/kg) verringerte die Wirkung von Levromakalim zeitabhängig, d.h. bis 15 min nach der Infusion von Levromakalim (Abb. 8), während Glibenclamid selbst keine Wirkung auf die Herzfrequenz ausübte (Abb. 8). Diese Daten waren nicht von denen nach der Infusion des carriers unterschiedlich, der Übersichtlichkeit halber wurden sie weggelassen. Die Dosis-Wirkungskurven und die signifikante Reduktion des Levromakalimeffektes durch Glibenclamid im Vergleich zur Infusion des Lösungsmittels (Abb. 8) weisen spezifische, K_{ATP} -Kanal-vermittelte Reaktionen nach, in denen Sulfonylharnstoffrezeptoren eine ausschlaggebende Rolle spielen.

Die Reaktionen auf eine Levromakalim- bzw. Glibenclamidinfusion mit nachfolgender Applikation von Levromakalim in den Phasen nach der Futteraufnahme sind der Abb. 9 zu entnehmen. Die Herzfrequenzdaten sind als Differenzen der Kleinste-Quadrat-Mittelwerte \pm SEM in den angegebenen Zeitspannen zu den Kleinste-Quadrat-Mittelwerten der Nüchterungsphase (00.00-06.00 Uhr), als Basalwert bezeichnet, angegeben. Dadurch wurde ein Teil der individuellen Differenzen eliminiert, um allgemeinere Informationen über die Reaktion der vier Versuchstiere in jeder Gruppe zu erlangen. In dieser Abbildung werden die Gruppen mit einer Versorgung an umsetzbarer Energie 1,5-fach und 2,0-fach des Erhaltungsbedarfs als restriktiv bzw. ad libitum ausgewiesen, weil eine Versorgung 2,0-fach des Erhaltungsbedarfs das Aufnahmevermögen dieser Jungbullen überschritt..

In der Periode 60 min nach der Futteraufnahme reagierte nur die Ad-libitum-Gruppe mit einer signifikanten ($P=0,01$) geringeren Differenz zum Basalwert auf eine vorhergehende Levromakalimverabreichung (Abb. 9A). Diese Differenz verschwand durch eine Vorbehandlung mit Glibenclamid (Abb. 9A). Nach der Futteraufnahme am Nachmittag reagierte die Herzfrequenz der levromakalimbehandelten Jungbullen der restriktiven Gruppe nicht mehr signifikant mit einem Anstieg auf die Futteraufnahme im Gegensatz zu der Ad-libitum-Gruppe (Abb. 9B). In letzterer war die Reaktion durch eine Vorbehandlung mit Glibenclamid völlig aufhebbar (Abb. 9B), eine Hinweis auf spezifische, durch

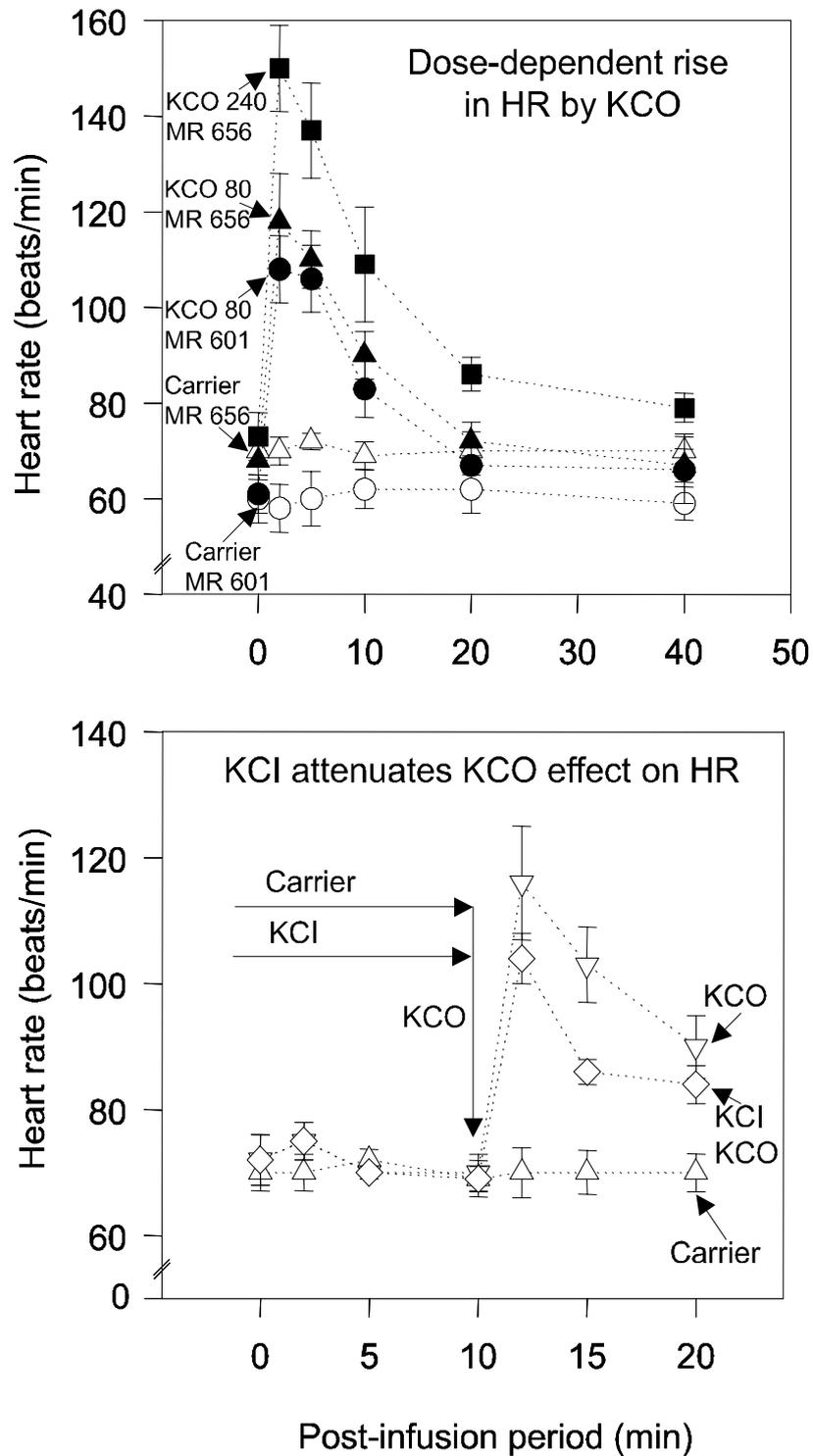


Abb.8 Dosisabhängige Erhöhung der Herzfrequenz durch den KATP-Kanal-Öffner (KCO) Levcromakalim und Reduktion der Wirkung durch den KATP-Kanal-Inhibitor (KCI) Glibenclamid nach einer Nüchternungsphase über Nacht

In die Untersuchungen wurden drei Jungbullen, die umsetzbare Energie 1,5- (MR-601) und zweifach (MR-656) des Erhaltungsbedarfs erhielten, einbezogen. KCO wurde in einer Dosis von 80 und 240 nMol/kg im Vergleich zum Lösungsmittel (carrier) verabreicht. Die Herzfrequenz (Mittelwert \pm SD) wurde als Verlaufskurve wiedergegeben. Der Effekt einer Vorbehandlung mit Glibenclamid (480 nMol/kg) oder dem Lösungsmittel (carrier) auf die nach 10 min erfolgende Infusion von KCO (80 nMol/kg) ist in dem unteren Abbildungsabschnitt dargestellt. In dieses Experiment wurden nur drei Jungbullen, die umsetzbare Energie zweifach des Erhaltungsbedarfes erhielten, einbezogen. Die Glibenclamidvorbehandlung schwächte die Levcromakalimwirkung signifikant (in Abhängigkeit von der Zeit) ab.

Sulfonylharnstoffrezeptoren vermittelte Wirkungen. In der restriktiven Gruppe reduzierte eine Glibenclamidvorbehandlung den Levcromakalimeffekt (Abb. 9B), ein Hinweis auf eine unterschiedliche Sensitivität der Sulfonylharnstoffrezeptoren gegenüber Glibenclamid, da die Dosis von Glibenclamid (480 nMol/kg) und Levcromakalim (80 nMol/kg) in diesem Versuch konstant gehalten wurde.

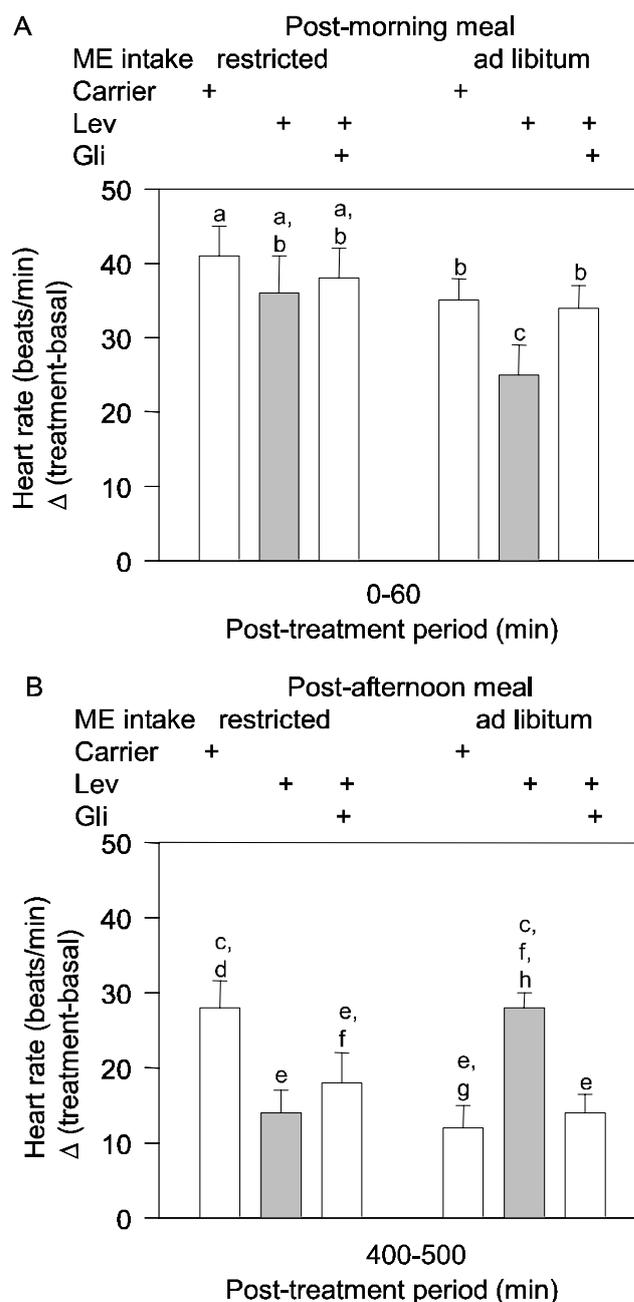


Abb.9 Die Futteraufnahmeinduzierte Herzfrequenzänderung wird durch Levromakalim (Lev) in Abhängigkeit von der Zeit und von der Diät entweder reduziert oder potenziert

Jeweils vier Jungbullen, die umsetzbaren Energie 1,5- (restriktiv) oder 2,0-fach (ad libitum) des Erhaltungsbedarfes erhielten, wurde Lev (80 nMol/kg), Glibenclamid (Gli, 480 nMol/kg) und nach 10 min Lev oder das Lösungsmittel für Lev bzw. Gli (carrier) verabreicht. Die Reaktion der Herzfrequenz ist als Differenz zum Basalwert (Nüchternungsphase über Nacht) dargestellt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Differenzen an. Der Übersichtlichkeit halber wurde die Reaktion auf Lev herausgehoben. Nach der Behandlung wurde am Morgen (0-60 min) und am Nachmittag (400-500 min nach Infusion) die Futterration verabreicht. Die Reaktionen auf Lev wurden durch Gli entweder verringert oder aufgehoben. Besonders augenfällig ist die entgegengesetzte Reaktion der Futteraufnahmeinduzierten Herzfrequenz der beiden Diätgruppen auf Lev am Nachmittag.

6.2 Invasive Erhebungen

6.2.1 Blutflussmessungen an der Saphenavene

Die Präparation der Saphenavene zur Befestigung der Messsonde war problemlos durchführbar. Abgesehen von der Hautinzision, verlief der operative Eingriff blutarm. Die Indikatoren für eine akut-entzündliche Phase einer Immunreaktion unter Einbeziehung der Aktivierung des Komplementsystems (CRP, C3c) waren nicht signifikant erhöht. Die elektromagnetische Messung setzte voraus, dass die Sonde, die das Gefäß umschloss, den Durchmesser des Gefäßes etwas reduzierte, um einen hinreichenden Kontakt zwischen Gefäßaußenwand und Sondeninnenwand zu gewährleisten. Infolge individueller Differenzen im Saphenavenendurchmesser wurde das Gefäßlumen etwa 20-30% durch die Sonde verringert. Die Reduktion oder der Eingriff selbst löste eine lokale, individuell unterschiedliche Fibrinogenaktivierung aus (mit intensiver Anlagerung fibrinogener Strukturen im Bereich der Reduktionsstelle). Deshalb zeigte die Sonde verlässliche Blutflusswerte nur bis etwa 48h nach der Verlegung an. Um den Tieren Gelegenheit zum Hinlegen zu geben, wurden die Elektrodenanschlüsse und Bauchgurte täglich um 16.00 Uhr entfernt. Zwei Versuchstiere wurden aus den Versuchsergebnissen ausgeschlossen. Ein Bulle entwickelte eine abnormales Futteraufnahmeverhalten durch eine vorrangige Futteraufnahme in der Nacht. Bei einem anderen Bullen wich die anatomische Position der Saphenavene von der normalen stark ab. Das erschwerte die exakten Blutflussmessungen. Dadurch verringerte sich die Gruppenanzahl auf je 3 Versuchstiere.

6.2.2 Blutflussreaktion auf die Futteraufnahme

Der basale Blutfluss lag bei der MR-656-Gruppe um 6 ± 2 ml/min (Abb. 10A-C), bei der MR-601-Gruppe um 35 ± 10 ml/min (Abb. 10D-F). Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass die basale Stoffwechselintensität bei Aufnahme von umsetzbarer Energie ad libitum mit einer Änderung im basalen, venösen Blutfluss der Hinterextremitäten einhergeht. Der Blutfluss der MR-656-Gruppe reagierte auf eine Futteraufnahme (Feeding in Abb. 10) sofort entweder bei der Morgenfütterung oder Nachmittagsfütterung mit einem Anstieg (Abb. 10A-C) unter den Bedingungen einer Lösungsmittelinfusion (carrier in Abb. 10), die als Kontrolle für die Levchromakalimininfusion diente. Dieser Anstieg war bei einem Versuchstier wegen großer Streuungen in der Basalphase nur in der Tendenz ausgeprägt

(Abb. 10C). Jedoch war auch bei diesem Tier die suppressive Wirkung von Levcromakalim auf den futteraufnahmeinduzierten Blutfluss bei der Nachmittagsfütterung klar zu erkennen.

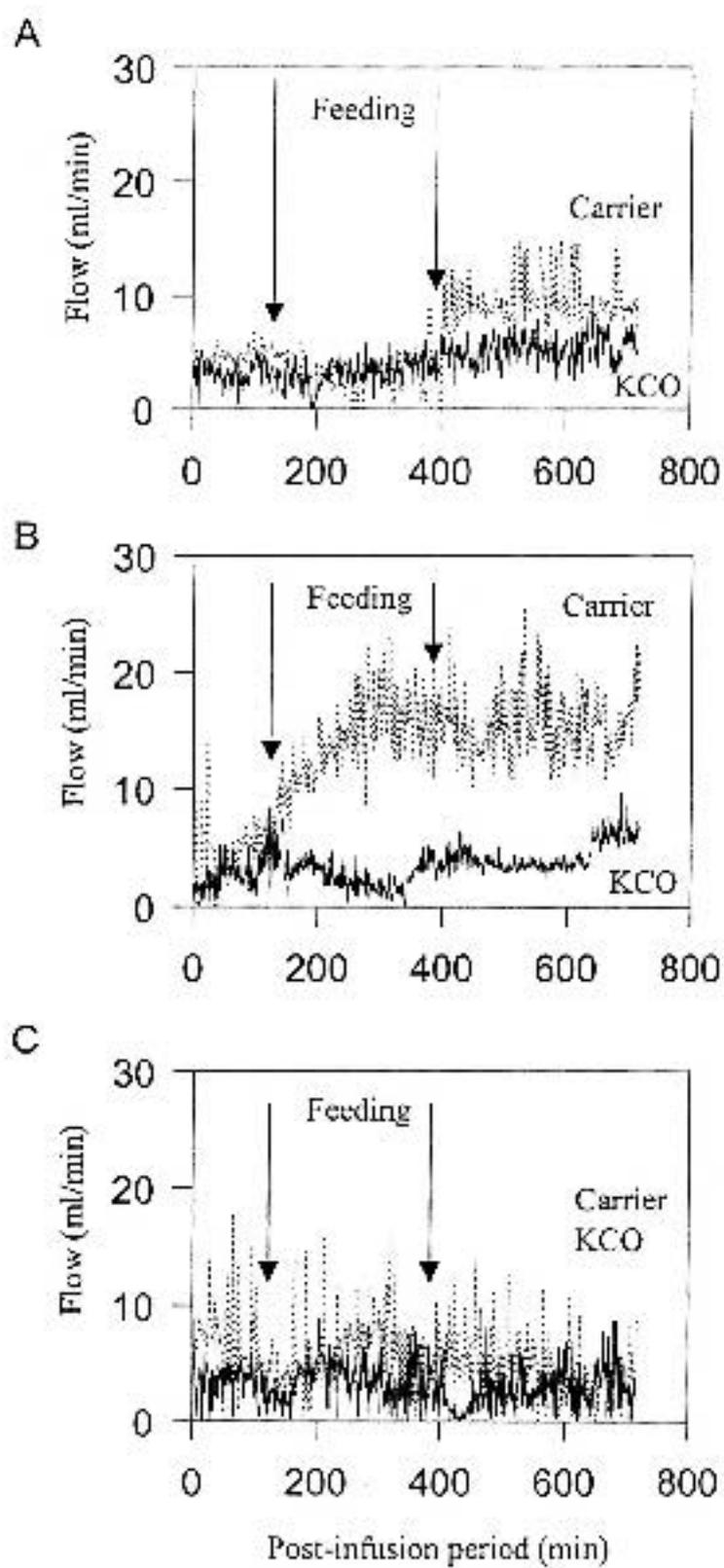
6.2.3 Blutflussreaktion auf Levcromakalim

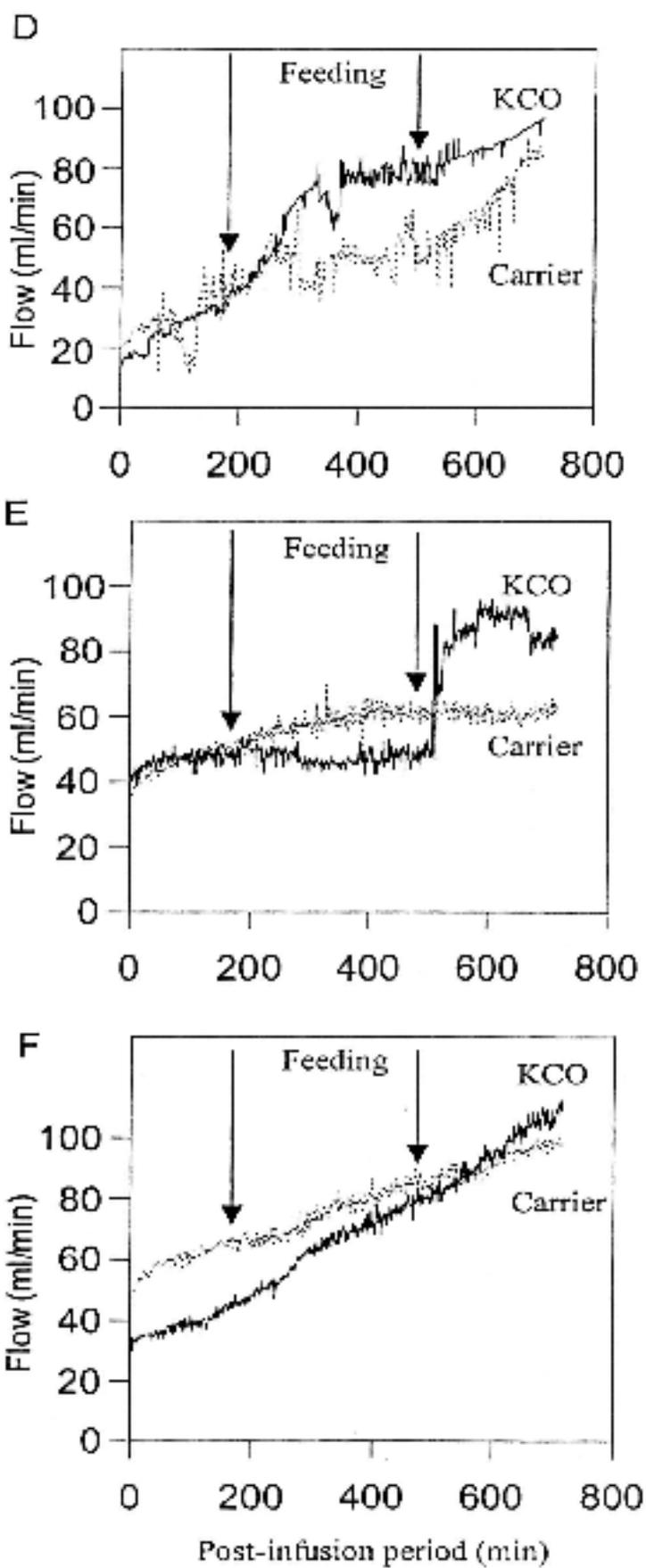
Um zu prüfen, ob eine Öffnung von KATP-Kanälen eine Wirkung auf den Blutfluss ausübt, wurde Levcromakalim, in der Abb. 10 als KCO bezeichnet, in einer Dosis von 80 nMol/kg in der Nüchternphase verabreicht. Die Blutflussreaktion in der MR-656-Gruppe (Abb. 10A-C) unterschied sich stark von der Reaktion der MR-601-Gruppe (Abb. 10D-F).

Im Gegensatz zu den erheblichen individuellen Differenzen in der Blutflussreaktion auf die Futteraufnahme löste Levcromakalim eine Hemmung dieser Reaktion bei allen Versuchstieren der MR-656-Gruppe aus (Abb. 10A-C). Die Versuchstiere der MR-601-Gruppe reagierte entgegengesetzt. Entweder nach der Morgenfütterung oder der Nachmittagsfütterung stieg der Blutfluss nach einer Levcromakaliminfusion im Vergleich zur Lösungsmittelinfusion an (Abb. 10D-F). Diese Wirkung trat bei allen Tieren auf, war folglich in drei unabhängigen Versuchen wiederholbar. Eine Quantifizierung war aber wegen der starken individuellen Unterschiede im Reaktionsmuster schwierig durchzuführen. Abgesehen von dem Quantifizierungsproblem, zeigen diese Ergebnisse, dass eine Aktivierung von KATP-Kanälen einen klaren Einfluss auf die venöse Blutflussregulation ausübt. Die Ergebnisse weisen jedoch auch nach, dass Änderungen in der Funktion dieser Kanäle in Reaktion auf eine Aufnahme von umsetzbarer Energie ad libitum auftreten, die entweder auf venöser oder systemischer Ebene stattgefunden haben.

Abb.10 Der Saphenablutfluß in Abhängigkeit von der Futteraufnahme, der Aktivierung von KATP-Kanälen durch Levcromakalim (KCO) und der Diät

Die Abbildungsabschnitte A, B, C demonstrieren den Blutfluss von drei Jungbullen, die umsetzbare Energie ad libitum (2,0-fach des Erhaltungsbedarfes) erhielten; D, E, F zeigen den Blutfluss von drei Jungbullen, die umsetzbare Energie 1,5-fach des Erhaltungsbedarfes erhielten, in Reaktion auf KCO (80 nMol/kg) oder das Lösungsmittel (carrier) bzw. die Futteraufnahme (feeding). KCO hemmt nahezu vollständig den futteraufnahmeinduzierten Blutflussanstieg bei der Verabreichung von umsetzbarer Energie ad libitum (A, B, C) im Gegensatz zur Reaktion bei restriktiver Verabreichung von umsetzbarer Energie (D, E, F).





6.2.4 Zusammenfassender Überblick der Herzfrequenz- und Blutflußreaktion auf Futterraufnahme und pharmakologische Behandlung

Ein genereller Überblick über die Reaktion der Herzfrequenz und des Blutflusses der einzelnen Probanden ist in der Tabelle 8 dargestellt. In ihr wurden der Einfluß der Futterraufnahme sowie der Behandlung mit Levkromacalim bzw. Glibenclamid und nachfolgend Levkromacalim berücksichtigt. Deutlich ist der unterschiedliche Einfluß von Levkromacalim auf den Blutfluß sowie auf die Herzfrequenz in Abhängigkeit der Fütterungszeit bei den Tieren in den jeweiligen Diätgruppen zu erkennen.

Tabelle 8: Übersicht der Beeinflussbarkeit der Herzfrequenz und des Blutflusses durch die Nahrungsaufnahme und durch pharmakologische Liganden

	Basal		Behandlung							
	Futterraufnahme		Morgenfütterung				Nachmittagfütterung			
	HF	BF	Lev		Gli + Lev		Lev		Gli + Lev	
	HF	BF	HF	BF	HF	BF	HF	BF	HF	BF
MR 656										
Rind 1	↑↑↑↑	↓	↑	↔	↑↑↑	/	↑↑↑↑	↔	↑	/
Rind 2	↑↑↑↑	↓	↑	↔	↑↑↑	/	↑↑↑↑	↔	↑	/
Rind 3	↑↑↑↑	↓	↑	↔	↑↑↑	/	↑↑↑↑	↔	↑	/
MR 601										
Rind 4	↑↑↑↑	↓	↑↑	↑	↑↑↑	/	↑	↑	↑↑	/
Rind 5	↑↑↑↑	↓	↑↑	↔	↑↑↑	/	↑	↑	↑↑	/
Rind 6	↑↑↑↑	↓	↑↑	↔	↑↑↑	/	↑	↑	↑↑	/

HF = Herzfrequenz, BF = Blutfluß
Lev. = Levkromacalim, Gli. = Glibenclamid
 ↑ = geringgradige Veränderung
 ↑↑ = mittelgradige Veränderung
 ↑↑↑ = hochgradige Veränderung
 ↔ = keine meßbare Veränderung
 / = keine Meßergebnisse

Dargestellt sind die zwei Diätgruppen mit einer Wärmeproduktion (metabolic rate, MR) von 656 und 601 kJ/kg^{0,75} d mit der jeweiligen Einzeltierauswertung. Die Intensität der Reaktionen bezog sich auf die Werte der Herzfrequenz und des Blutflusses in der Nüchterungsphase ohne Fütterungs- bzw. pharmakologische Beeinflussung. Der Basalwert in Spalte 1 wurde am Tag ohne Gabe eines pharmakologischen Liganden unter Berücksichtigung der Reaktion durch Futterraufnahme ermittelt. In der Spalte Behandlung wurden die Daten der Futterraufnahme in Daten der Morgen- bzw. der Nachmittagfütterung getrennt und jeweils die Reaktion der Herzfrequenz des Blutflusses auf Levkromacalim bzw. Glibenclamid und anschließend Levkromacalim ausgewertet.

6.2.5 Glibenclamidbindungsanalysen

6.2.5.1 Monozyten

Eine Annäherung an die Ursachen einer Funktionsänderung von K_{ATP}-Kanälen kann durch Ermittlung der Bindungseigenschaften von Liganden an Sulfonylharnstoffrezeptoren erreicht werden. Rindermonozyten verfügen über Sulfonylharnstoffrezeptoren (Löhrke et al. 1997). Um auszuschließen, dass bereits die Lösungsmittelinfusion die Sulfonylharnstoffrezeptoreigenschaften verändert, wurde die Reaktion der Glibenclamidbindung von zirkulierenden Monozyten als (in vivo problemlos zu gewinnende) Indikatorzellen geprüft. Die Messung der Bindung des fluoreszenten Glibenclamidderivates, Glibenclamid Bodipy, erfolgte direkt mit der Flußzytometrie. Diese Messtechnik gestattet die Sortierung der Monozyten aus einer Gesamtleukozytenpräparation (ausgehend von heparinisiertem Blut), so dass der Einfluss der Präparationstechnik minimiert wird. Diese Herangehensweise lieferte Sättigungskurven (Abb. 11), die auf spezifische Bindungen hinweisen. Die aufeinanderfolgende tägliche Untersuchung der Monozyten (Nüchternungsphase) von unbehandelten Versuchstieren (basal), von Versuchstieren nach einer Lösungsmittelbehandlung (carrier) und nach Levromakaliminfusion (80nMol/kg) am folgenden (KCO1) und nachfolgenden (KCO2) Tag ergab, dass Basal- und Lösungsmittelwerte sich nicht unterscheiden. Das trifft auch für KCO2 in der MR-656-Gruppe (Abb. 11B) zu, nicht aber für KCO2 in der MR-601-Gruppe (Abb. 11A).

Die Asymptote der KCO2-Kurve der MR-601-Gruppe zeigt, dass die Glibenclamidbindungsstellen durch Levromakalim verringert worden ist. Dagegen blieb die Dissoziationskonstante, K_D , in beiden Gruppen unverändert (Vergleich Abb. 11A gegenüber B). Das weist darauf hin, dass der Monozyten-Rezeptortyp, der in einer vorhergehenden Untersuchung als SUR2B/Kir6.2 identifiziert worden ist (Löhrke et al. 1997), nicht auf die Behandlung selbst reagiert. Nach dem K_D -Kriterium unterscheidet sich aber die Affinität der Sulfonylharnstoffrezeptoren zu Glibenclamid in beiden Diätgruppen ($P=0,01$). Möglicherweise wird das auf eine Verringerung in der Expression von Kir6.1 bei Aufnahme von umsetzbarer Energie ad libitum zurückzuführen sein. Zur Klärung dieser Möglichkeit bedarf es einer Analyse der Transkripte, die K_{ATP}-Kanalproteine kodieren, oder einer elektrophysiologischen Charakterisierung.

6.2.5.2 Herz- und Saphenamyozyten

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K_D) der Glibenclamidbindung bei Herz- und Saphenamyozyten war ähnlich der Konstante von Monozyten bei einer Versorgung mit umsetzbarer Energie 1,5-fach des Erhaltungsbedarfs (MEM 1,5 in der Abb. 12) signifikant ($P=0,04$) niedriger als K_D der MEM-2,0-Gruppe. Herzmuskelzellen haben jedoch mindestens eine dreifach höhere Sulfonylharnstoffrezeptordichte im Vergleich zu Monozyten (Abb. 12 gegenüber Abb. 11) und eine mindestens vierfach höhere Dichte (MR-601-Gruppe) im Vergleich zu Saphenavenenmyozyten (Abb. 12, Einschub). Bei einer Aufnahme von umsetzbarer Energie ad libitum durch ein Angebot 2,0-fach des Erhaltungsbedarfs (korrespondierend mit MR-656 in Abb. 12, Einschub), verringerte sich die Anzahl an Glibenclamidrezeptoren/Herzmyozyte, während die von Saphenamyozyten zu einem Anstieg tendierte (Abb. 12, Einschub). Da der Anstieg jedoch nicht mit einer K_D -Änderung verbunden war, wurde kein Hinweis auf eine Veränderung der venösen KATP-Kanalstruktur durch die Diät erhalten.

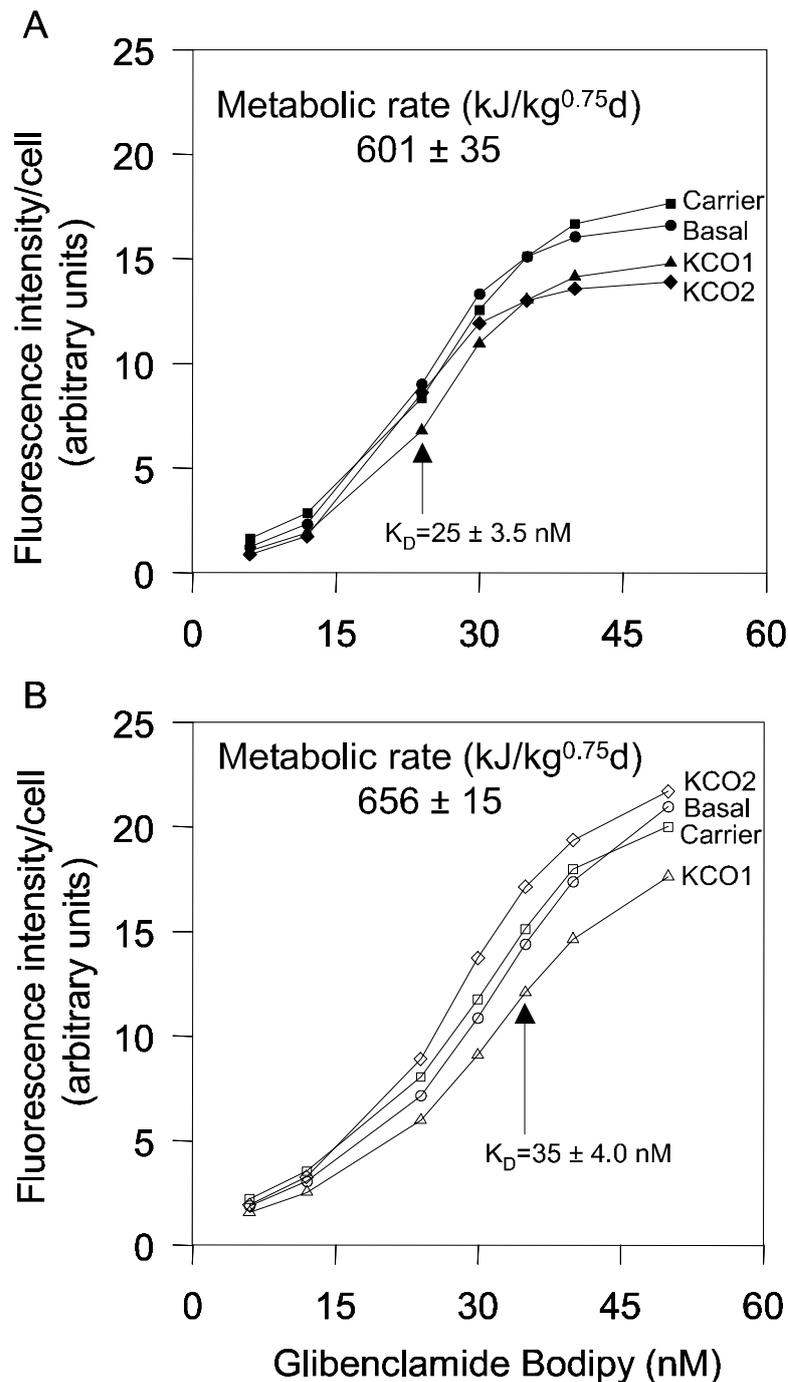


Abb.11 Glibenclamidbindung durch Monozyten

Glibenclamid wurde in einer fluoreszenten Form (Glibenclamide Bodipy) verwendet. Die Fluoreszenz/Monozyte wurden fließzytometrisch gemessen. Die Monozyten stammten von je vier Jungbullern, die umsetzbare Energie 1,5-fach (A) und zweifach (B) des Erhaltungsbedarfes erhielten und eine basale Thermogenese (metabolic rate) der in (A) und (B) ausgewiesenen Höhe hatten. Die Blutproben wurden vor der Morgenfütterung am Tag vor einer Behandlung (basal), am Tag nach der Infusion des Lösungsmittels (carrier), am Tag nach einer Infusion (80 nMol/kg) von Levocromakalim (KCO1) und am folgenden Tag (KCO2) gezogen. Die Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung wurde unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt. Der Wendepunkt einer nichtlinearen Funktion, die an die in (A) und (B) dargestellten Messpunkte (Mittelwert von vier Tieren) angepasst worden ist, ergab die Dissoziationskonstante K_D . Sie unterscheidet sich zwischen (A) und (B) signifikant, während eine Behandlung mit Levocromakalim K_D nicht verändert. Dies weist in Übereinstimmung mit der Literatur auf unabhängige Bindungsstellen für Levocromakalim und Glibenclamid hin.

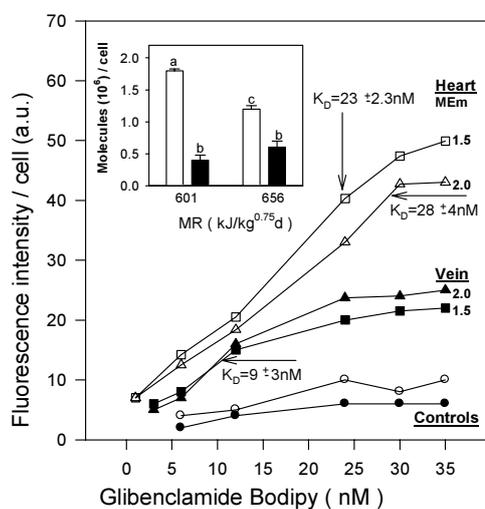


Abb.12 Glibenclamidbindung durch Herz- und Saphenamyozyten

Die Gewebeproben stammen von je vier Jungbullen, die umsetzbare Energie 1,5-fach (1,5-MEm bzw. MR-601) und zweifach (2,0-MEm bzw. MR-656) des Erhaltungsbedarfes erhielten. Die Myozyten wurden durch eine Kollagenaseverdauung erhalten, mit einem fluoreszenten Glibenclamidderivat (Glibenclamide Bodipy) inkubiert, flußzytometrisch sortiert und die Fluoreszenz/Einzelzelle gemessen. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (KD) wurde, wie in der Abb.11 beschrieben, bestimmt. Die Zahl der Rezeptormoleküle/Einzelzelle (Einschub) wurde über Eichung der Fluoreszenzintensität/Zelle gegen Standardpartikel mit bekannter Zahl an fluoreszenten Molekülen berechnet. KD von Ventrikelmiozyten unterscheidet sich zwischen den Gruppen im Gegensatz zu KD von venösen Myozyten. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen (Mittelwerte \pm SD) im Einschub zeigen signifikante Differenzen an.

6.2.6 Analyse von Transkripten, die Bestandteile der KATP-Kanäle kodieren

Die Reaktionen der Herzfrequenz auf Levromakalim, die durch Glibenclamid teilweise oder völlig aufhebbar waren, und die Unterschiede zwischen den MR-601- und MR-656-Gruppen in den Glibenclamidbindungseigenschaften ließen vermuten, dass durch Aufnahme von umsetzbarer Energie ad libitum eine Veränderung in der Struktur der KATP-Kanäle im Herzmuskel vonstatten ging. Diese Vermutung wurde durch die Analyse von Transkripten überprüft, die strukturelle Proteine der KATP-Kanäle kodieren. In der früheren Literatur wurde die SUR2A/Kir6.2 Kombination als typisch für den Herzmuskel beschrieben (Chutkow et al. 1996). In einer neueren Untersuchung wurde ebenfalls SUR2B in Kombination mit Kir6.2, möglicherweise auch mit Kir6.1, als wahrscheinlich

angesehen (Liss et al. 1999). Deshalb wurden in Proben aus dem rechten Ventrikel Transkripte, die SUR2A-, SUR2B-, Kir6.1- und Kir 6.2-Proteine kodieren, untersucht. Die Ergebnisse sind in der Abb. 13 dargestellt. Diese Abbildung spiegelt Ergebnisse aus Agarosegelelektrophoresen wider. Die Agarosegelelektrophorese trennt die mRNA-cDNA von Produkten eines Primerpaares, das sowohl SUR2A als auch SUR2B erzeugt, in Ventrikelproben von der MR-601-Gruppe deutlich auf (Abb. 13B, Bahnen 5-7). Die SUR2A-Form war in der MR-656-Gruppe nur andeutungsweise nachweisbar (Abb. 13B, Bahnen 1-3). Kir6.1- und Kir6.2-mRNA-cDNA war in beiden Gruppen nachweisbar (Abb. 13C und D). Möglicherweise bestanden quantitative Differenzen zwischen den Gruppen, jedoch hat die elektrophoretische Darstellung qualitativen Charakter. Sie wurde gewählt, um eindeutig Unterschiede im molekularen Muster zwischen den Gruppen zu erkennen.

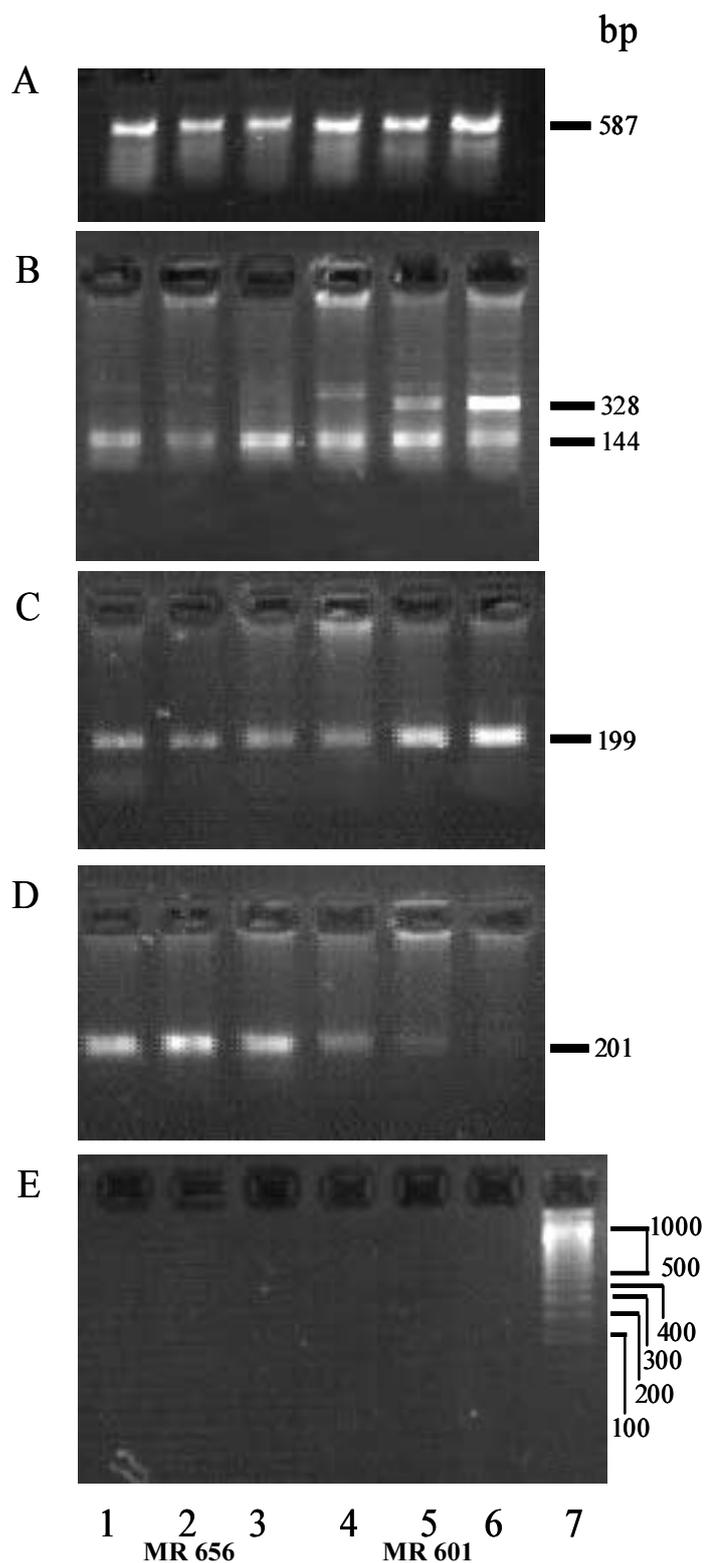


Abb.13 Analyse von Transkripten, die KATP-Kanal-Proteine kodieren, im Ventrikeltgewebe
 Dargestellt ist die Fluoreszenz der gefärbten cDNA aus der RT-PCR nach elektrophoretischer Trennung im Agarosegel. In der RT-PCR wurde Gesamt-RNA und ein spezifisches Primerpaar für die jeweilige mRNA verwendet: (A) β -Actin, (B) SUR2A (328 bp) und SUR2B (144 bp), (C) Kir6.1, (D) Kir6.2. Die genomische Kontrolle mit einem DNA-Fragmentstandard wird in (E) gezeigt. Bahnen 1-3 und 4-6 stellen die Ergebnisse für jeweils drei Versuchstiere der Gruppen dar, die umsetzbare Energie 1,5-fach und zweifach des Erhaltungsbedarfes erhielten. SUR2A ist nur in Ventrikeln der Jungbullen, die umsetzbare Energie 1,5-fach des Erhaltungsbedarfes erhielten, deutlich nachweisbar.