

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Alle Experimente wurden an männlichen Wistar-Ratten (HsdCpb : WU, 220–250g) der Firma Harlan Winkelmann (Borchen) durchgeführt. Nach Anlieferung durch den Züchter wurden die Tiere zur Eingewöhnung 10 bis 14 Tage in der institutseigenen Tierhaltung bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus mit der Lichtphase von 5.00 bis 17.00 Uhr gehalten. Die Raumtemperatur betrug 22 ± 2 °C und die relative Luftfeuchtigkeit $60 \pm 5\%$. Die Ratten saßen während der Eingewöhnungsphase in Gruppen von maximal fünf Tieren in Makrolon-Standardkäfigen der Größe 4 (38 cm x 20 cm x 59 cm) mit *ad libitum* Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter von Altromin ® 1324 (Lage, Deutschland)

Zum Schutz der implantierten Führungskanülen wurden die operierten Tiere bis zum Tag des Mikrodialyseexperimentes einzeln in zylindrische Kunststoffkäfige (37 x 37 cm) mit freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser umgesetzt, in denen auch die Versuche durchgeführt wurden. Die Dauer der Einzelhaltung umfasste 7 bis 8 Tage. Zur Minimierung des Isolationsstresses wurden die Ratten im gleichen Raum mit Hör- und Geruchskontakt zu anderen Ratten gehalten. Um in allen Versuchsvorhaben dieselben Ausgangsbedingungen zu gewährleisten, wurden auch die für die Blutglukosemessungen vorgesehenen Ratten über denselben Zeitraum in Einzelhaltung untergebracht. Jedes Tier wurde unabhängig vom Versuchsvorhaben nur einmal verwendet.

Die Durchführung der in dieser Arbeit vorgestellten Tierversuche wurde unter den Tierversuchsnummern G 0010/02, G 0276/03 und G 0037/03 des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technischer Sicherheit in Berlin genehmigt.

3.1.2. Fütterungsregime

Die Untersuchungen wurden im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme und in Abhängigkeit vom Fütterungsstatus durchgeführt. Nicht-futterdeprivierten Ratten stand in den Tagen vor dem Versuch wie gewohnt Futter *ad libitum* zur Verfügung. Futterdeprivierte Ratten wurden vor dem Versuch 24 Stunden nahrungskarent gehalten.

Im Verlauf der Mikrodialyseversuche zur Bestimmung der Absolutkonzentration von Glukose im VMH (3.1.4.) erhielten die Ratten kein Futter.

In den Mikrodialyseversuchen zur Bestimmung der Änderung des Konzentrationsverlaufes extrazellulärer Glukose und Laktat im VMH (3.1.5.) befand sich bereits bei Versuchsbeginn Futter für die Tiere wahrnehmbar, aber für diese nicht zugänglich, im Versuchsraum. Während den Ratten in der Lichtphase des Versuches (13.30 Uhr bis 17.00 Uhr) kein Futter angeboten wurde, erhielten sie mit Beginn der Dunkelphase (17.00 Uhr) Futter *ad libitum*. Den Kontrolltieren dieser Versuchsreihe wurde dagegen in der Dunkelphase kein Futter angeboten. Des weiteren befand sich bei den Kontrolltieren zu keinem Zeitpunkt des Versuches Futter im Versuchsraum. Sobald die Tiere mit Beginn der Dunkelphase Futter erhielten, begannen sie mit der Nahrungsaufnahme.

Das Fütterungsregime der Blutglukosemessung entsprach dem der Mikrodialyseversuche zur Bestimmung der Änderung des Konzentrationsverlaufes extrazellulärer Glukose und Laktat im ventromedialen Hypothalamus.

3.1.3. Mikrodialyse im ventromedialen Hypothalamus

Operative Vorbereitung

Für die Mikrodialyseversuche wurde den Tieren eine Führungskanüle (CMA12 Guide Cannula, CMA/Microdialysis, Solna, Schweden) zur Fixierung der Mikrodialysesonde implantiert (Abb. 1). Dafür wurden die Ratten mit Pentobarbital (60 mg/kg i.p.) narkotisiert und mittels eines stereotaktischen Präzisionsrahmens fixiert. Nach Rasur und Desinfektion der Kopfhaut mit einer alkoholischen Lösung wurde mit einem Skalpell die Haut über der Schädeldecke im Bereich des Bregmas durch einen Längsschnitt eröffnet und der Schädelknochen vom Periost befreit. Ausgehend vom Bregma, dem Schnittpunkt von Sagittal- und Kreuznaht, wurden nun die Koordinaten für die Position der Führungskanüle über dem Zielgebiet bestimmt. Die Zielkoordinaten für die Kerngebiete des VMH wurden anhand des Hirnatlas nach Paxinos und Watson (1986) ermittelt. Die ventrale Koordinate wurde von der Dura mater aus derart berechnet, dass die aus dem Schaft der Führungskanüle herausragende Sonde genau im Zielgebiet zu liegen kommt. Die Koordinaten für den ventromedialen Hypothalamus betragen 2,5 mm posterior des Bregmas, -0,5 mm lateral der Sagittalnaht und 8,0 mm ventral der Dura mater. Da die Sonde 1,0 mm über die Führungskanüle hinausreichte, wurde so eine intracraniale Gesamttiefe von 9,0 mm erreicht. Mit einem Feinmechanikbohrer (\varnothing 1,0 mm) wurde das Schädeldach an der ermittelten Stelle durchbohrt. Zusätzlich wurden der frontale und der parietale

Schädelknochen mit zwei weiteren Löchern versehen, in welche die Verankerungsschrauben aus Edelstahl (\varnothing 1,0 mm, CMA/Microdialysis) zur Fixierung der Führungskanüle eingesetzt wurden. Anschließend wurde die an einem stereotaktischen Arm befestigte Führungskanüle vorsichtig über dem Zielgebiet ausgerichtet und abgesenkt. Die Führungskanüle wurde mit Methylacrylzement (Technovit® 3040, Fa. Kulzer, Wehrheim) an Schrauben und Schädelknochen fixiert. Nach dem Aushärten des Zementes wurde der Hautschnitt abschließend mit einer einzelnen Heftnaht durch chirurgisches Nahtmaterial (Vicryl® 2-0/metric3) verschlossen. Das Operationsfeld wurde während des gesamten Eingriffes wiederholt mit Lokalanästhetikum (Lidocain, Xylocain® Pumpspray) behandelt. Während der Aufwachphase befand sich das operierte Tier unter kontinuierlicher Beobachtung. Um in dieser Zeit ein Auskühlen zu verhindern, wurde der Käfig auf eine Wärmeplatte gestellt. Anschließend kam die Ratte zurück in die Tierhaltung. Bis Versuchsbeginn erhielten die Ratten eine Erholungszeit von sieben bis acht Tagen in Einzelhaltung. In dieser Zeit erreichten die Tiere wieder mindestens ihre präoperative Körpermasse. Die Lokalisation der Sonde wurde nach Beendigung des Experiments verifiziert.

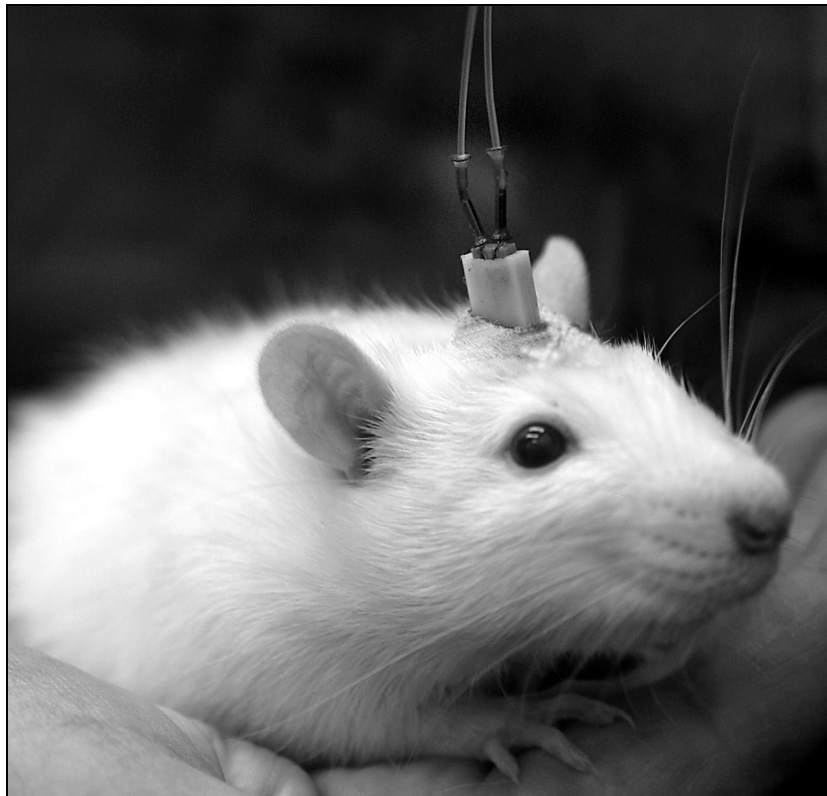


Abbildung 1: Ratte mit implantierter Führungskanüle und bereits eingesetzter Mikrodialysesonde etwa eine Woche nach der Operation.

Dialysematerial und Messtechnik

Für die Messungen im VMH wurden Sonden vom Typ CMA/12 mit einem Membrandurchmesser von 0,5 mm, einer Membranlänge von 1.0 mm und einer Moleküldurchlässigkeit (cut-off) von 20.000 Dalton der Firma CMA/Microdialysis, Solna, Schweden eingesetzt (Abb. 2). Als Perfusionsflüssigkeit wurde sowohl bei der Vorbereitung der Sonden als auch bei der Durchführung der Mikrodialyseversuche eine artifiziell hergestellte und der zerebralen Extrazellulärflüssigkeit angepasste Lösung verwendet (aCSF). Die Zusammensetzung dieser Lösung bestand aus entionisiertem Wasser mit 124 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 27 mM NaHCO₃, 0,5 mM NaH₂PO₄ H₂O, 2,4 mM Na₂HPO₄ 2H₂O, 0,5 mM Na₂SO₄, 1,0 mM MgCl₂ 6H₂O und 1,0 mM CaCl₂ 2 H₂O. In den Mikrodialyseversuchen zur Bestimmung der Absolutkonzentration von Glukose im VMH enthielt die Perfusionslösung zusätzlich Glukose in Konzentrationen von 0,5 mM bis 3,0 mM. Vor jeder Anwendung wurde die Lösung gefiltert und im UV-Bad entgast. Der pH-Wert wurde vor jedem Mikrodialyseversuch mit H₂PO₄ auf 7,4 eingestellt.

Die Sonden wurden vor Gebrauch zunächst 30 Minuten mit Ethanol (70%) und anschließend eine Stunde mit aCSF gespült. Sowohl bei Erst- als auch bei Mehrfachverwendung der Sonden wurde jeweils vor und nach jedem Mikrodialyseexperiment mittels *in vitro* Versuchen die relative Wiederfindungsrate (%) bestimmt. Für diese Qualitätsprüfung wurden die Sonden mit aCSF perfundiert und bei einer den Versuchsbedingungen entsprechenden Flussrate von 1,0 µl/min die relative Wiederfindungsrate für Glukose aus einer Glukose-Standardlösung (2,0 mM) bestimmt. Die relative Wiederfindungsrate musste für einen Gebrauch der Sonden vom Typ CMA/10 mindestens 8% betragen.

Zur Durchführung der Mikrodialyseexperimente wurden die Sonden an ein Schlauchsystem (FEP Tubing, CMA/Microdialysis) angeschlossen und kontinuierlich mittels einer Mikroinjektionspumpe (CMA/102, CMA/Microdialysis) bei einer Flussrate von 1,0 µl/min mit aCSF perfundiert. Im Intervall von 10 Minuten konnte so ein Dialysatvolumen von 10,0 µl gewonnen werden. Die einzelnen Fraktionen wurden in Plastikgefäßen (Mikrovials, 300 µl, CMA/Microdialysis) aufgefangen und nach Zentrifugation bei -18°C tiefgefroren und am darauffolgenden Tag analysiert.

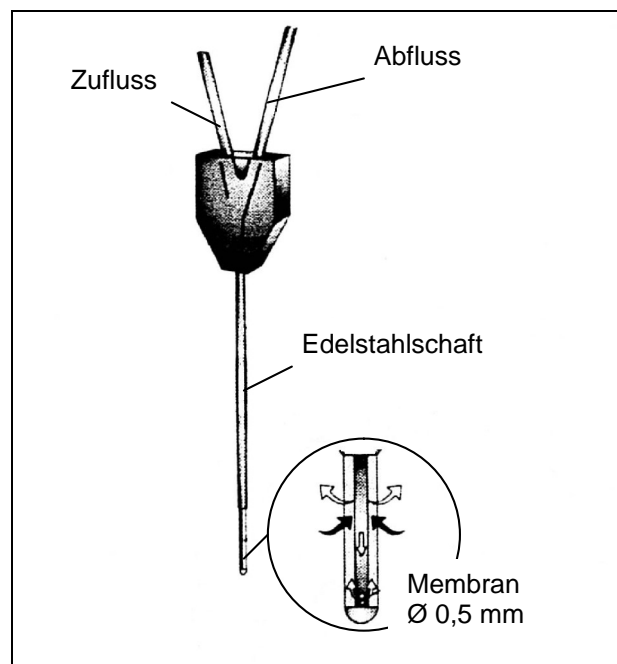


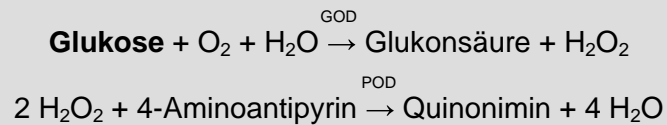
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Mikro dialyse sonde vom Typ CMA/12 (CMA/Microdialysis, Solna, Schweden)

Die Analyse der gewonnenen Mikro dialysate erfolgte mit Hilfe des CMA 600 Microdialysis Analyser (CMA/Microdialysis). Dieses Verfahren stellt eine Methode zur direkten enzymatisch-photometrischen Analyse verschiedener Substanzen speziell aus geringen Mikro dialysatvolumina dar, die sowohl im experimentellen als auch im klinischen Bereich zum Einsatz kommt. Hier wurden aus den gewonnenen Mikro dialysat-Fractionen (10 μ l) die Gehalte von Glukose, Laktat und Pyruvat ermittelt.

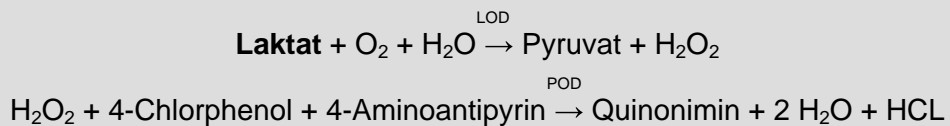
Standardwerte CMA 600 Microdialysis Analyser für den experimentellen Gebrauch			
	Glukose	Laktat	Pyruvat
λ (nm)	546	546	546
Messbereich (mM)	0,02 – 6,0	0,02 – 2,5	2,0 – 300
erforderliche Probenvolumina (μ l)	2,0	0,8	2,0

Tabelle 2: Standardwerte CMA 600 Microdialysis Analyser für den experimentellen Gebrauch. Entnommen aus der Bedienungsanleitung für den CMA 600 Microdialysis Analyser (CMA/Microdialysis).

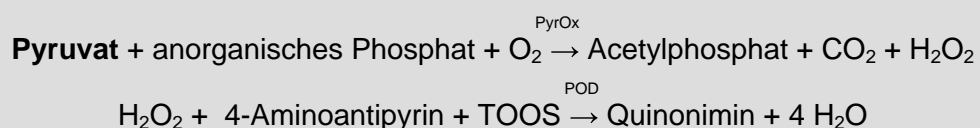
Glukose wird enzymatisch durch Glukose-Oxidase (GOD) oxidiert. Das dabei gebildete Wasserstoffperoxid reagiert mit Phenol und 4-Aminoantipyrin. Diese Reaktion wird durch Peroxidase (POD) katalysiert und erzeugt das rot-violett gefärbte Quinonimin. Dessen Bildungsrate wird photometrisch bei 546 nm gemessen und ist proportional der Glukosekonzentration.



Laktat wird enzymatisch durch Laktat-Oxidase (LOD) oxidiert. Das dabei gebildete Wasserstoffperoxid reagiert mit 4-Chlorphenol und 4-Aminoantipyrin. Diese Reaktion wird durch Peroxidase (POD) katalysiert und erzeugt das rot-violett gefärbte Quinonimin. Dessen Bildungsrate wird photometrisch bei 546 nm gemessen und ist proportional der Laktatkonzentration.



Pyruvat wird enzymatisch durch Pyruvat-Oxidase (PyrOx) oxidiert. Das dabei gebildete Wasserstoffperoxid reagiert mit N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidine (TOOS) und 4-Aminoantipyrin. Diese Reaktion wird durch Peroxidase (POD) katalysiert und erzeugt das rot-violett gefärbte Quinonimin. Dessen Bildungsrate wird photometrisch bei 546 nm gemessen und ist proportional der Pyruvatkonzentration.



3.1.4. Mikrodialyseversuche zur Bestimmung der Absolutkonzentration von Glukose im ventromedialen Hypothalamus bei nicht-futterdeprivierten und bei futterdeprivierten Ratten

Zero Net Flux-Mikrodialyse (ZNF)

Mittels Mikrodialyse können Konzentrationsänderungen von Substanzen des Extrazellularraumes im Vergleich zu einem Ausgangsniveau gemessen werden. Für die Bestimmung der absoluten Glukosekonzentrationen im Extrazellularraum des VMH wurde die *Zero Net Flux-Mikrodialyse (ZNF-Mikrodialyse)*, Lönnroth et al., 1987) angewandt. Bei dieser Methode wird durch die Mikrodialysesonden Perfusionsflüssigkeit mit verschiedenen Glukosekonzentrationen (gCSF) gepumpt. Ist die Glukosekonzentration in der Perfusionsflüssigkeit größer als im extrazellulären Gewebe, diffundiert Glukose über die Sondenmembran in das umliegende Gewebe, ist sie dagegen geringer, diffundiert cerebrale Glukose über die Membran in das Innere der Sonde. Aus der Differenz der im Mikrodialysat gemessenen Konzentration und der perfundierten Konzentration wird der Nettofluss von Glukose errechnet und gegen die Glukosekonzentration der Perfusionsflüssigkeit graphisch aufgetragen. Über eine lineare Regression wird der Schnittpunkt mit der x-Achse ermittelt. An diesem Punkt entspricht die extrazelluläre Glukosekonzentration im VMH der Konzentration in der Perfusionsflüssigkeit.

Versuchsdurchführung

Die Versuche fanden am siebten bis achten Tag nach Implantation der Führungskanüle in der Zeit von 11.30 Uhr bis 16.40 Uhr statt. Während des Versuches konnten sich die Tiere in ihrem Heimatkäfig frei bewegen und hatten freien Zugang zu Trinkwasser. Die ZNF-Mikrodialyse wurde an nicht-futterdeprivierten und an futterdeprivierten Ratten durchgeführt. Futter wurde den Ratten im Verlauf des Versuches nicht angeboten.

Die vorbereiteten Sonden wurden den Tieren ohne Narkose zwei Stunden vor Gewinnung der ersten Dialysate über die Führungskanülen eingesetzt. Um eine freie Beweglichkeit in den Käfigen zu ermöglichen, wurde der zuleitende Mikrodialyseschlauch der Sonde über einen Balance-Arm geführt und an die Mikroinjektionspumpe angeschlossen. An dem ableitenden Mikrodialyseschlauch der Sonde wurde ca. 20 cm über dem Tier ein Auffanggefäß (Vial) befestigt. Das Dialysesystem wurde bei einer Flussrate von 1,0 µl/min mit einer artifiziell hergestellten CSF perfundiert, die Glukose in unterschiedlichen

Konzentrationen enthielt (gCSF). Die Sonden wurden bei jedem Tier mit gCSF von 0.0, 0.5, 1.0, 1.5 und 3.0 mM in jeweils aufsteigender Reihenfolge perfundiert.

Die Zeit von dem Einsetzen der Sonde bis zu der Gewinnung des ersten Dialysates (120 Min.) diente der Equilibrierung der Diffusionsvorgänge und Stabilisierung der Basislinie. Anschließend wurden sechs aufeinanderfolgende Dialysate in Intervallen von zehn Minuten in den Auffanggefäßen gesammelt und daraus die Basislinie ermittelt. Nach jedem Konzentrationswechsel wurde eine Vorlaufzeit von 20 Minuten eingehalten, um die Diffusionsvorgänge an der Sondenmembran neu zu equilibrieren. Die diesem Vorlauf folgende 10-Minuten-Fraktion diente der Bestimmung des Nettoflusses von Glukose über die Sondenmembran.

Im Anschluss an den Versuch wurden die Tiere euthanasiert (Pentobarbital), die Gehirne entnommen und bei -86°C tiefgefroren.

3.1.5. Mikrodialyseversuche zur Bestimmung der Änderung des Konzentrationsverlaufes von Glukose, Laktat und Pyruvat im ventromedialen Hypothalamus im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme

Die Versuche fanden sieben bis acht Tage nach Implantation der Führungskanüle in der Zeit von 13.30 Uhr bis 19.00 Uhr statt und wurden an nicht-futterdeprivierten Tieren durchgeführt. In einer zweiten Versuchsanordnung wurden futterdeprivierte Ratten getestet (Abb.3). Während des Versuches konnten sich die Tiere in ihrem Heimatkäfig frei bewegen und hatten während des gesamten Versuches freien Zugang zu Trinkwasser. Das Versuchsdesign war so angelegt, dass im Versuchszeitraum sowohl Licht- als auch Dunkelphase enthalten waren, um dem natürlichen Fressverhalten und dem Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere gerecht zu werden. Über eine automatische Zeitschaltuhr wurde im Versuchsraum das Lichtregime entsprechend den Lichtverhältnissen in der Tierhaltung mit der hellen Phase von 5.00 Uhr bis 17.00 Uhr reguliert. Mit Beginn der Dunkelphase (17.00 Uhr) wurden die Tiere gefüttert. Die Menge des aufgenommenen Futters wurde nach der ersten und nach der zweiten Stunde nach Beginn der Nahrungsaufnahme bestimmt. Innerhalb beider Versuchsanordnungen wurden Ratten, denen mit Beginn der Dunkelphase kein Futter angeboten wurde, als Kontrollgruppe eingesetzt (Abb. 3).

Sondenvorbereitung, Einsetzen der Sonden und Aufbau der Mikrodialysetechnik ist den Versuchen zur Bestimmung der Absolutkonzentration von Glukose analog. Im Gegensatz zu der ZNF-Mikrodialyse enthielt hier die aCSF keine Glukose. Die Dialysate wurden nach 120

Minuten Equilibrierungsphase kontinuierlich bis Versuchsende im Intervall von zehn Minuten gesammelt. Die ersten sechs aufeinander folgenden 10-Minuten-Fractionen nach der Equilibrierung dienen der Erstellung der Basislinie. Im Anschluss an den Versuch wurden die Tiere euthanasiert (Pentobarbital), die Gehirne entnommen und bei -86°C tiefgefroren.

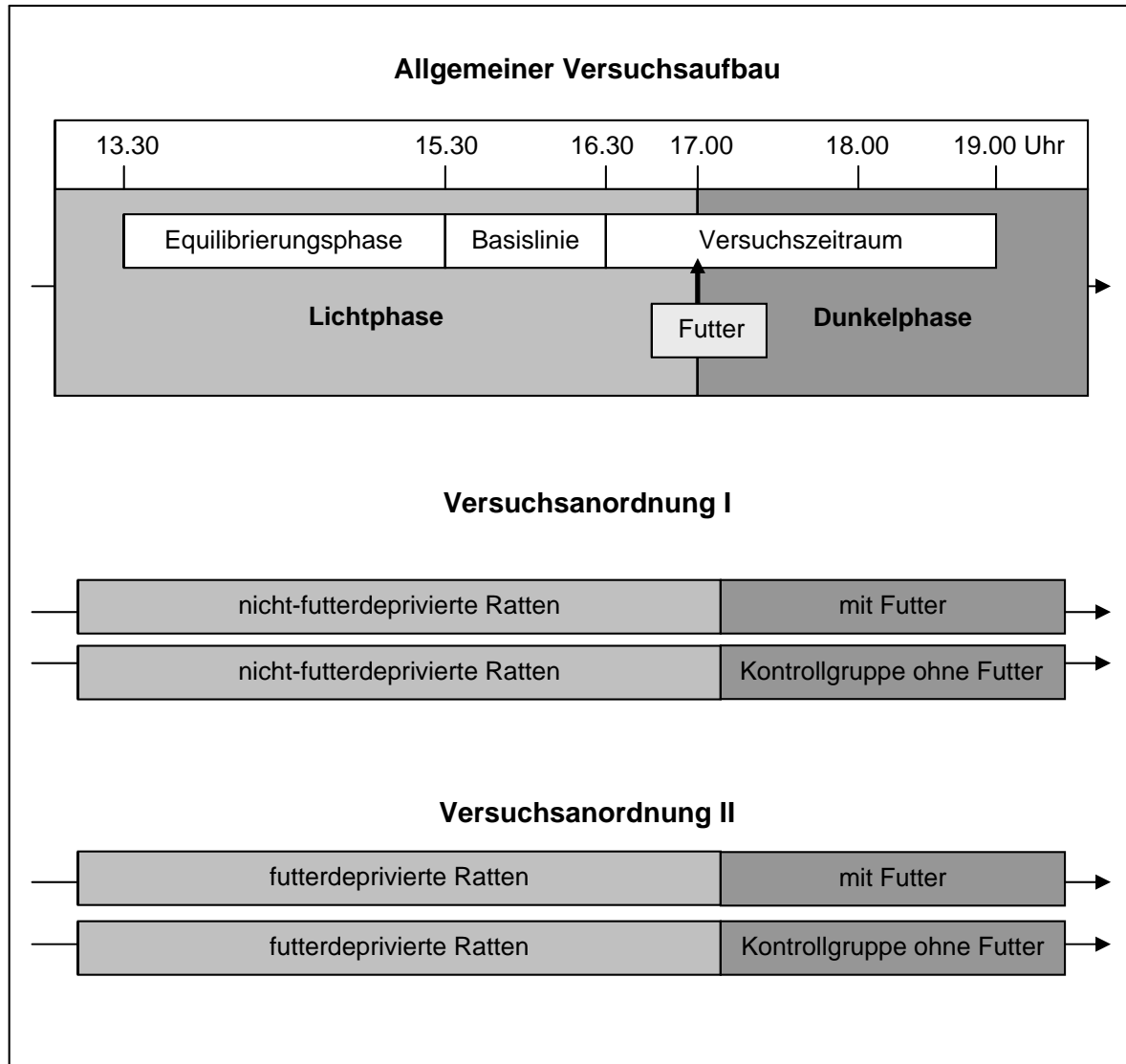


Abbildung 3.: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung und der Tiergruppen der Mikrodialyseversuche zur Bestimmung der Änderung des Konzentrationsverlaufes von Glukose und Laktat im VMH. Nicht-futterdeprivierten Ratten stand in den Tagen vor dem Experiment wie gewohnt Futter *ad libitum* zur Verfügung. Im Gegensatz dazu wurden die futterdeprivierten Ratten der Versuchsanordnung II in den letzten 24 Stunden bis zu Versuchsbeginn nahrungskarent gehalten.

3.1.6. Histologische Auswertung

Die histologischen Untersuchungen wurden zur Überprüfung des korrekten Sitzes der Mikrodialysesonde durchgeführt. Aus den tiefgefrorenen Rattenhirnen wurden mit einem Gefrierschnittmikrotom von rostral nach kaudal 30 µm dicke Schnitte angefertigt. Anhand des Paxinos/Watson-Atlas wurde von einem unabhängigen Beobachter die Lokalisation der Sonden beurteilt. War der Sondensitz nicht eindeutig im Zielgebiet lokalisiert, wurden die Daten dieser Tiere nicht in die statistische Auswertung mit einbezogen.

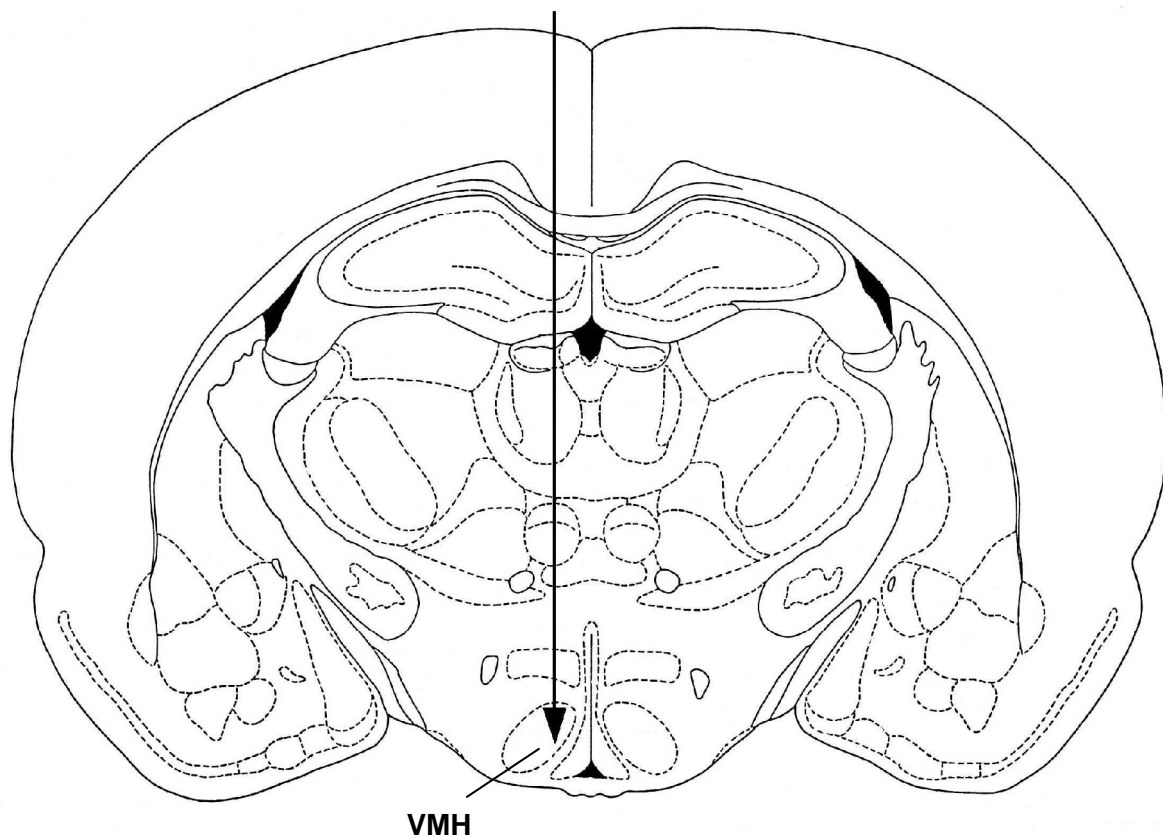


Abbildung 4: Schematische Darstellung des VMH modifiziert nach Paxinos & Watson (1986). Der Pfeil markiert die Spitze der Mikrodialysesonde. Die Koordinaten für den VMH betragen 2,5 mm posterior des Bregmas, - 0,5 mm lateral der Sagittalnaht und 8,0 mm ventral der Dura mater.

3.1.7. Bestimmung der Blutglukosekonzentrationen

Zur Bestimmung der Blutglukosekonzentrationen wurde ein Blutzuckermessgerät der Firma Bayer (Glukometer® DEX™) verwendet. Da für die Messung der Blutglukose sehr geringe Blutmengen ausreichend sind, wurde als Entnahmetechnik die Punktion der Schwanzspitze mittels einer Injektionskanüle (Neolus 27G/0,4 mm, Terumo) gewählt. Jede Ratte wurde nur einmal zur Blutentnahme verwendet.

Um einen Bezug zwischen VMH-Glukosekonzentration und Blutglukosekonzentration herstellen zu können, wurden für die Messung der Blutglukose Zeitpunkte gewählt, die dem Versuchsablauf der Mikrodialyseversuche zur Bestimmung der Änderung des Konzentrationsverlaufes von Glukose entnommen wurden (Abb. 3). Die ausgewählten Messzeitpunkte entsprechen (1) dem Zeitpunkt des letzten Basislinienwertes, (2) 10 Minuten vor Beginn der Nahrungsaufnahme und (3) 60 Minuten nach Beginn der Nahrungsaufnahme (Abb. 5). Die Werte der verschiedenen Messzeitpunkte stammen von verschiedenen Tieren. Um für die Versuche zur Bestimmung der Blutglukosekonzentrationen dieselben Ausgangsbedingungen zu gewährleisten wie für die Mikrodialyseversuche, wurden auch die für die Blutglukosemessungen vorgesehenen Ratten vor dem Versuch sieben bis acht Tage in Einzelhaltung untergebracht. Die Versuche wurden an nicht-futterdeprivierten Ratten durchgeführt. Mit Beginn der Dunkelphase (17.00 Uhr) wurden die Tiere gefüttert. Die Menge des aufgenommenen Futters wurde eine Stunde nach Beginn der Nahrungsaufnahme bestimmt.

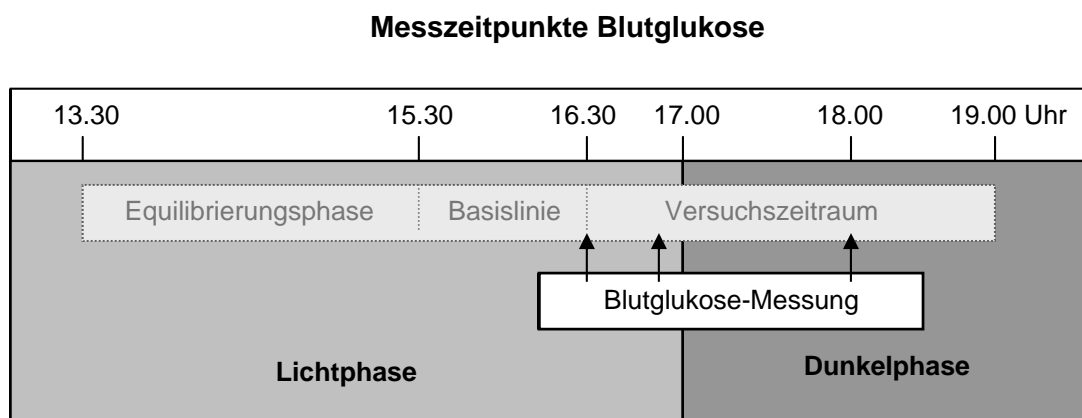


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Messzeitpunkte zur Bestimmung der Blutglukosekonzentration im Vergleich zum Versuchsaufbau der Mikrodialyseversuche zur Bestimmung der Änderung des Konzentrationsverlaufes von Glukose.

3.1.8. Versuchsauswertung und statistisches Verfahren

Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphiken erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism, Version 3.00 für Windows, GraphPad Software (San Diego, California, USA).

Es wurden nur die Tiere in die Auswertung der Mikrodialyseversuche einbezogen, bei denen die Sondenspitze eindeutig im Gebiet des VMH lag. Daraus erklären sich die unterschiedlichen n-Zahlen der einzelnen Versuchsgruppen. Der Anteil der Versuche, bei denen die Sonde nicht einwandfrei im Zielgebiet lag, betrug etwa 10%.

Mikrodialyseversuche zur Bestimmung der Absolutkonzentration von Glukose im VMH bei nicht-futterdeprivierten und bei futterdeprivierten Ratten (ZNF)

Der Nettofluss von Glukose $\Delta [G]$ über die Sondenmembran wurde aus der Differenz der gemessenen Glukosekonzentration des Dialysates $[G]_{\text{Dialysat}}$ und der Glukosekonzentration des Perfusates $[G]_{\text{Perfusat}}$ errechnet. Aus den Einzelwerten wurde für jede perfundierte Konzentration das arithmetische Mittel aller Tiere angegeben und graphisch gegen die Glukosekonzentration des Perfusates $[G]_{\text{Perfusat}}$ aufgetragen. Mittels linearer Regression wurde der Schnittpunkt mit der x-Achse bestimmt. An diesem Punkt ist der Nettofluss von Glukose gleich null und entspricht der tatsächlichen extrazellulären Glukosekonzentration im VMH (Lönroth et al., 1987; McNay & Gold, 1999).

$$\text{Nettofluss von Glukose} = \Delta [G] = ([G]_{\text{Dialysat}} - [G]_{\text{Perfusat}})$$

Mikrodialyseversuche zur Bestimmung der Änderung des Konzentrationsverlaufes von Glukose, Laktat und Pyruvat im VMH im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme

Um analysieren zu können, ob ein Zusammenhang zwischen der Initiierung der Nahrungsaufnahme und dem ventromedialen Konzentrationsverlauf Glukose und Laktat besteht, wurde bei der Auswertung der gewonnenen Daten besonderes Augenmerk auf Änderungen des Konzentrationsverlaufes in den letzten 30 Minuten vor Beginn der Nahrungsaufnahme gelegt und dieser zunächst separat vom Rest des Versuches betrachtet.

Glukose, Laktat und Pyruvat wurden jeweils vom gleichen Tier bestimmt. Die innerhalb einer Versuchsgruppe auftretenden unterschiedlichen Angaben zu den n-Zahlen von Glukose und Laktat erklären sich aufgrund von Gerätefehlern des CMA 600 Mikrodialysis Analysers.

Da die Substratkonzentrationen der gewonnenen Mikrodialysate interindividuelle Unterschiede zeigten, wurden die Daten eines jeden Tieres für Glukose und Laktat prozentual angegeben. Aus den ersten sechs aufeinander folgenden Dialysaten wurde der Durchschnitt ermittelt und gleich 100% gesetzt (Basislinie). Alle Werte wurden darauf bezogen.

Im Gegensatz dazu wurden zur Bestimmung des ventromedialen Laktat/Pyruvat-Quotienten die in den Mikrodialysaten gemessenen Absolutwerte von Laktat und Pyruvat ins Verhältnis zueinander gesetzt. Die ersten sechs aufeinander folgenden Werte bilden die Basislinie.

Innerhalb von Versuchsgruppen wurden Änderungen des Konzentrationsverlaufes im Vergleich zum letzten Wert der Basislinie mittels Varianzanalyse für verbundene Stichproben auf Signifikanz überprüft und anschließend durch einen multiplen Vergleichstest (Test nach Dunnett) ausgewertet.

Für Zwischengruppenvergleiche wurden die Änderungen des Konzentrationsverlaufes mittels der Trapezregel als Fläche unter der Kurve (AUC) ausgedrückt. Anschließend wurden die Daten bei Normalverteilung mittels ungepaartem t-Test nach Student verglichen. Wurde die Nullhypothese, dass die Daten normalverteilt sind abgelehnt, wurde der U-Test nach Mann-Whitney verwendet.

Zusammenhänge zwischen aufgenommener Futtermenge und Änderungen des Konzentrationsverlaufes im VMH bzw. zwischen Futtermenge und Blutglukosekonzentration wurden mittels der Korrelationsanalyse nach Pearson untersucht.

Zur Gewährleistung einer einheitlichen graphischen Darstellung wurden sowohl für normalverteilte als auch für nicht-normalverteilte Daten generell die arithmetischen Mittel und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Ein statistisch signifikanter Unterschied lag vor, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug.