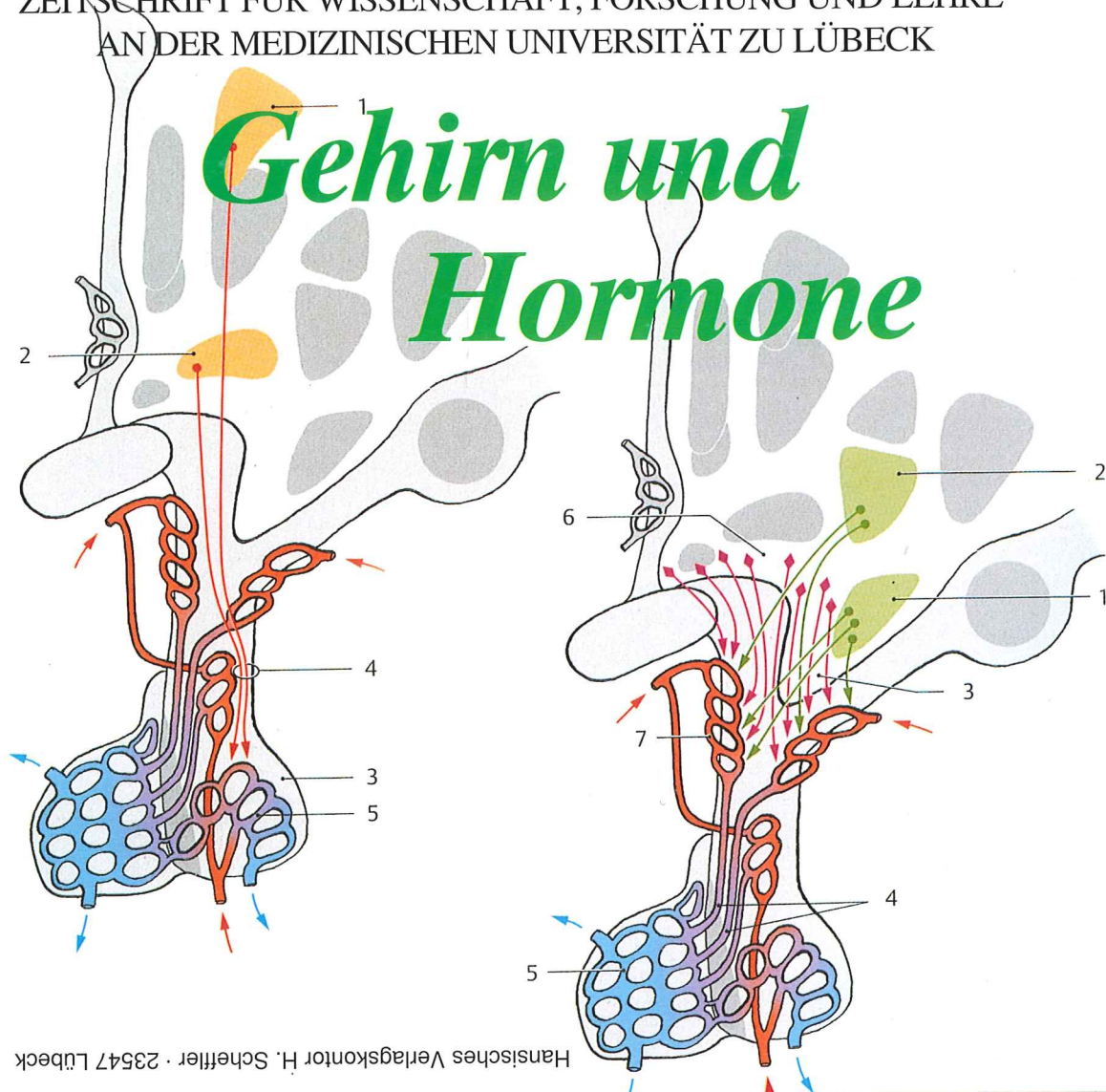


FOCUS MUL



ZEITSCHRIFT FÜR WISSENSCHAFT, FORSCHUNG UND LEHRE
AN DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Gehirn und Hormone





SCHERING



Was gibt es Schöneres als einen Partner, auf den man sich verlassen kann?

Wer sich in der bildgebenden Diagnostik für Schering entscheidet, hat einen Partner gefunden, der zusammen mit ihm an einer kontinuierlichen Verbesserung der Diagnosestellung arbeitet. Mit anspruchsvollem Service und zahlreichen Fortbildungsveranstaltungen, z.B. für MRT, Ultraschall und Spiral-CT. Gut, einen so kompetenten Partner an seiner Seite zu wissen.



**Schering
Diagnostika**

<http://www.kontrastmittel.de>

Wissenschaft plus Partnerschaft.

Inhalt

Editorial

- Das Gehirn des Internisten 208
H. L. Fehm
-

Übersicht

- Vom „tropfigen Material“ in Nervenzellen zur Neurosekretion – eine kurze Historie der Neuroendokrinologie 211
W. Kühnel
-

Originalarbeiten

- Geschlechtsspezifische Expression der Präpro-Orexin und Orexin-Rezeptor mRNA in peripheren Organen 217
O. Jöhren, S. J. Neidert, M. Kummer und P. Dominiak
- Möglichkeiten der Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophyse-Ovar (HPO)-Achse durch GnRH-Analoga in der Gynäkologie 225
R. Felberbaum und K. Diedrich
- Effekte von Insulin-like growth factor I und II und Insulin auf gonadotrope Hypophysenzellen 230
J. M. Weiss, Y.-X. Xia, M. Chi, S. Polack, K. Diedrich und O. Ortmann
- Melanocortine als hypothalamische Regulatoren der menschlichen Fettmasse 236
J. Born, R. Smolnik und H. L. Fehm
- Vasopressin verbessert nach subchronischer intranasaler Therapie die neuroendokrine Architektur des Schlafs alter Menschen 245
B. Perras, S. Assmus, K. Rödder, F. Albrecht, J. Born und H. L. Fehm
- Insulin und Kognition 255
W. Kern
-

Aus der Hochschule

- Kraft, Ausdauer und Erfindungsgeist 265
H. Arnold

Personalia

267

Medizinische Gesellschaft

269

Das Titelbild dieser Themenausgabe ist dem Übersichtsbeitrag über die Geschichte der Neuroendokrinologie entnommen (S. 211 ff).

Das Gehirn des Internisten

Zurecht wird die Innere Medizin als die Mutter der medizinischen Wissenschaft betrachtet: Viele der heute selbstverständlichen medizinischen Disziplinen haben sich aus der Inneren Medizin abgespalten, z. B. die Neurologie. Diese Abspaltungen waren im Zuge der Spezialisierung notwendig und sinnvoll; dennoch bergen sie selbstverständlich Gefahren, wenn es um die ganzheitliche Betrachtung des kranken Menschen geht. Mit der Abspaltung der Neurologie aus der Inneren Medizin wurde die Innere Medizin sozusagen „anenzephal“. Dies ist deswegen problematisch, weil man als Konstruktivist im Sinne von Francisco Varela und Humberto Maturana die Aufgabe der inneren Organe darin sehen muss, die Funktion des Zentralnervensystems zu gewährleisten und weil das ZNS die Funktionen der meisten peripheren Organe beeinflusst bzw. kontrolliert. Aus diesem Grunde ist es von großer Wichtigkeit, dass einer Entwicklung, die zu einer zunehmenden Aufteilung der Medizin in Subdisziplinen führt und zu einer immer weiteren Spezialisierung, eine gegenläufige Entwicklung zur Seite gestellt wird, die die Fächervielfalt zusammenhält. Die Neuroendokrinologie hat sich in ihrer kurzen Geschichte zu einem Fach entwickelt, das eben dieses leisten kann.

Als Ernst und Berta Scharer in den 30er Jahren in Frankfurt in der Tiefe des ZNS Neuronen entdeckten, die mit Sekretgranula vollgestopft waren, und aus dieser Beobachtung das Konzept der Neurosekretion entwickelten, wurden sie anfänglich von vielen Seiten belächelt. Dass Neuronen neben ihren vielfältigen Aufgaben auch Peptidhormone synthetisieren und freisetzen sollen, schien vielen unvorstellbar. Das Konzept der Neurosekretion war aber die Voraussetzung, um die Suche nach den hypothalamischen Neuropeptiden beginnen zu können, die die Funktion der Hypophyse steuern, den sogenannten hypophysiotropen Hormonen. Es hat dann aber doch bis Anfang der 70er Jahre gedauert, bis das erste hypophysiotrope Hormon isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt war. Es handelt sich dabei um das extrem einfach gebaute Tripeptid des TSH-Releasing-Hormons (TRH); Roger Guillemin und Andrew Schally haben dafür den Nobelpreis erhalten. Damit war die Tür zur Entdeckung der übrigen hypophysiotropen Hormone des Hypothalamus aufgestoßen und in rascher Folge konnten nun die Struktur und die physiologische Bedeutung vieler weiterer hypothalamischer Neuropeptide geklärt werden. Es hat sich bald gezeigt, dass dieselben Neuropeptide nicht nur im Hypothalamus, sondern auch in Neuronen an vielen

Stellen des Zentralnervensystems gebildet werden und dass darüber hinaus eine riesige Zahl weiterer Neuropeptide in verschiedenen Neuronen des Zentralnervensystems gebildet wird. Unter den neu entdeckten Neuropeptiden waren so interessante Kandidaten wie die endogenen Opiate, also die Endorphine und Enkephali-

Hypothalamic hormones
Oxytocin (9 aar)
Vasopressin (9 aar)
Hypothalamic releasing and inhibiting hormones
Corticotropin releasing hormone (CRH) (41 aar)
Growth hormone releasing hormone (GHRH) (44 aar)
Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) (10 aar)
Somatostatin (+ several forms) (14 aar)
Thyrotropin releasing hormone (TRH) (3 aar)
Tachykinins
Neurokinin a (substance K) (10 aar)
Neurokinin B (10 aar)
Neuropeptide K (36 aar)
Substance P (11 aar)
Opioid peptides
β-endorphin (30 aar)
Dynorphin (17 aar)
Met- and leu-enkephalin (5 aar)
NPY and related peptides
Neuropeptide tyrosine (NPY) (36 aar)
Pancreatic polypeptide (36 aar)
Peptide tyrosin-tyrosin (PYY) (36 aar)
VIP-glucagon family
Glucagon-like peptide -1 (GLP-1) (29 aar)
Peptide histidine isoleucine (PHI) (27 aar)
Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) (28 aar)
Other peptides
Brain natriuretic peptide (32 aar)
Calcitonin gene-related peptide (CGRP) (37 aar)
Cholecystokinin (CCK) (8 aar)
Islet amyloid polypeptide (amylin) (37 aar)
Calcitonin (29 or 30 aar)
VIP-glucagon Melanin concentrating hormone (ACH) (19 aar)
Melanocortins (ACTH, α-MSH)
Neuropeptide FF (F8Fa) (8 aar)
Neurotensin (13 aar)
Parathyroid hormone related protein (34 aar)
„Novel“ neuropeptides
Agouti related protein (AGRP) (131 aar)
Cocaine and amphetamine regulated transcript [CART]
Endomorphin-1 and -2 (4 aar)
Hypocretins/orexins (29 or 30 aar)
Nociceptin/orphanin FQ
Prolactin releasing peptide (20 or 31 aar)

Tabelle 1: Tabelle der Neuropeptide. „aar“ bedeutet „amino acid residues“



ZEISS
LSM 510 META

Öffnet

Türen zu neuen Welten!

**Die nächste Generation:
Laser Scanning Mikroskop
LSM 510 META**

www.zeiss.de/lsm

ZEISS

ne, aber auch die Neuropeptide, die z. B. in der Regulation des Körpergewichts eine wichtige Rolle spielen wie die Orexine oder das Cocaine-and-Amphetamine-Related Transscript (CART). Eine Liste der bis jetzt entdeckten Neuropeptide zu erstellen, ist im Augenblick schwierig, weil nahezu monatlich neue Kandidaten hinzukommen. In der Tabelle 1 ist der Versuch gemacht worden, die bis jetzt bekannten Neuropeptide in einer sinnvollen Ordnung aufzulisten.

Für die meisten dieser Neuropeptide ist die physiologische Funktion derzeit noch unbekannt. Aber schon heute ist klar, dass die Untersuchung der zentralnervösen Funktion sich keineswegs auf die Untersuchung des Metabolismus der Neurotransmitter beschränken darf, sondern dass die zahllosen Neuropeptide in Betracht gezogen werden müssen. Die Manipulation der neuropeptidergen Mechanismen stellt einen der wichtigsten Forschungszweige in der Neurophysiologie der Zukunft dar.

Für die humane Physiologie und Pathophysiologie schienen die Neuropeptide lange Zeit deswegen nicht sehr interessant, weil sie jenseits der Blut/Hirn-Schranke liegen und damit der Erforschung aber auch natürlich der Manipulation zu therapeutischen Zwecken schwer zugänglich scheinen. Deswegen ist die Überwindung der Blut/Hirn-Schranke ein wichtiger methodischer Schritt. Eine Möglichkeit könnte darin bestehen, dass man Liganden für die neuronalen Rezeptoren entwickelt, die die Blut/Hirn-Schranke überwinden in

Analogie z. B. zu Opiaten und den zentralnervösen Opiat-Rezeptoren. Die Klinische Forschergruppe „Neuroendokrinologie“ der MUL hat über die Jahre hin zeigen können, dass ein zweiter Weg zur Überwindung der Blut/Hirn-Schranke die intranasale Applikation von Peptiden sein kann. Nach intranasaler Applikation können die Peptide innerhalb von Minuten im Liquor cerebrospinalis nachgewiesen werden und es kann gezeigt werden, dass zumindest bestimmte Untergruppen zentralnervöser Rezeptoren erreicht werden und damit zentralnervöse Funktionen beeinflusst werden können. Auf diese Weise können wichtige Körperfunktionen beeinflusst werden wie z. B. die Regulation des Körpergewichts, die Regulation des Blutdrucks, die Regulation des Schlaf/Wach-Verhaltens und vieles andere mehr.

Die Neuroendokrinologie ist somit in viele Bereiche der Inneren Medizin, aber auch in die Neurologie, Psychiatrie, gynäkologische Endokrinologie etc. eingedrungen. So ist es selbst Kardiologen selbstverständlich geworden, die Herzinsuffizienz als eine neuroendokrine Störung zu begreifen.

In den folgenden Beiträgen sind einige wenige Aspekte neuroendokrinologischer Forschung, wie sie in verschiedenen Bereichen der MUL geleistet wird, herausgegriffen und exemplarisch dargestellt. Dass dabei viele wichtige Aspekte zu kurz kommen, belegt nur, wie umfassend und wichtig dieser Forschungszweig ist. H.

H.L. Fehm

FOCUS MUL

Zeitschrift für Wissenschaft, Forschung und Lehre an der Medizinischen Universität zu Lübeck

Herausgeber: Das Rektorat der Medizinischen Universität zu Lübeck

Schriftleitung: H.-P. Bruch, W. Kühnel, Th. Martinetz, H.H. Wolff

Guest-Editor: A. Ch. Feller

Wissenschaftlicher Beirat: T. Aach, H. Arnold, R. Birngruber, S. Bulfone-Paus, K. Diedrich, H. v. Domarus, P. Dominiak, W. Dosch, D. v. Engelhardt, H. L. Fehm, A. Ch. Feller, W. Gross, H. Halsband, E. Hartmann, M. Herczeg, D. Hogrefe, F. Hohagen, W. Jelkmann, D. Jocham, H. A. Katus, R. Kessel, H. Kirchner, U. Knölker, D. Kömpf, E. Konecny, H. Laqua, V. Linnemann, J. Löhr, E. Maehle, P. Müller, D. O. Nutzinger, M. Oehmichen, Th. Peters, S. Pöppel, J. Prestin, H.-H. Raspe, K. R. Reischuk, E. Richter, E.-Th. Rietschel, G. Schäfer, F. Schmielau, P. Schmucker, E. Schwinger, G. Sezakiel, H. H. Sievers, W. Solbach, A.X. Trautwein, H. Weerda, H. D. Weiss, J. Westermann, H. H. Wolff, P. Zabel (alle Medizinische Universität zu Lübeck)

Redaktion: R. Labahn, Telefon (04 51) 5 00 30 04

Anschrift: Medizinische Universität zu Lübeck, Ratzeburger Allee 160, D-23562 Lübeck

Auflage: 5.000 Exemplare

Verlag: Hansisches Verlagskontor Heinz Scheffler, Mengstraße 16, D-23552 Lübeck, Telefon (04 51) 70 31-01

Anzeigen: Hansisches Verlagskontor H. Scheffler, Christiane Kermel

Druck: Verlag Schmidt-Römhild KG, Mengstraße 16, 23552 Lübeck, Telefon (04 51) 70 31-01

Erscheinen: FOCUS MUL erscheint vierteljährlich

Redaktionsschluss: 6 Wochen vorher

Bezugspreis: Einzelheft DM 18,-/€ 9,20, Jahresabonnement DM 70,-/€ 35,79 zuzügl. Versandkosten. In den Mitgliedsbeiträgen der Gesellschaft der Freunde und Förderer der Medizinischen Universität zu Lübeck enthalten

ISSN 0940-9998

Aus dem Institut für Anatomie (Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann)
der Medizinischen Universität zu Lübeck

Vom „tropfigen Material“ in Nervenzellen zur Neurosekretion – eine kurze Historie der Neuroendokrinologie

W. Kühnel

Das Zentralnervensystem des Menschen besteht aus etwa 10^{11} Neuronen, die netzartig verknüpft sind und über Synapsen miteinander kommunizieren. An diesen spezialisierten Kontaktstellen lösen besondere Überträgerstoffe, sog. Transmitter, Prozesse an der Nervenzellmembran aus, die zur Erregungsbildung oder Erregungshemmung führen. Stammesgeschichtlich lassen sich diese komplizierten Nervenetze von einfacheren Netzwerken der Wirbellosen ableiten, denn schon bei Nesseltieren (Polypen, Quallen, Seeanemonen) tritt ein primitives Nervensystem in Erscheinung, in dem u. a. eigentümliche, sekretorisch aktive Nervensinneszellen vorkommen (Lentz 1968; Golding and Whittle 1977). Aber auch im Zentralnervensystem von höheren Wirbellosen und Wirbeltieren findet man Nervenzellen, die den Charakter von Drüsenzellen haben, unter ihnen solche, die biologisch aktive Ketten von Aminosäuren, also Peptide bilden. Man nennt sie nach einem international akzeptierten Vorschlag eines meiner Lehrer, des Kieler Anatomen Wolfgang Bargmann (Abb. 3), „pep-

tiderge Neurone“ (Bargmann et al. 1967). Dieser Begriff wurde seinerzeit zur Unterscheidung von cholinergen und adrenergen Neuronen in der Pars intermedia der Katzen-Hypophyse geprägt. Inzwischen kennt man eine große Anzahl solcher Peptide. Beispiele: Für die Aufklärung der chemischen Natur des Vasopressins (Wasserhaushalt) und Oxytocins (Wehentätigkeit) erhielt Du Vigneaud den Nobelpreis 1955; ein weiterer Nobelpreis (1977) ging an Guillemin und Schally für die Aufklärung der Neuropeptide TRH (Schilddrüsensteuerung), LHRH (Fortpflanzung) und Somatostatin (Kontrolle des Wachstums) (Gersch und Richter 1981; Oksche 1985).

Die Erkenntnis, dass bestimmte Neurone im Gehirn Hormone produzieren, gehört heute zum Allgemeingut des biomedizinischen Wissens und hat in den letzten Jahrzehnten zur Entstehung einer neuen, sich stürmisch entwickelten Disziplin, der Neuroendokrinologie, beigetragen (Scharrer B 1979, 1987; Scharrer E und Scharrer B 1963), denn das sekretorische Neuron



Abb. 1 Ernst Scharrer, 1905-1965



Abb. 2 Berta Scharrer, 1906-1995

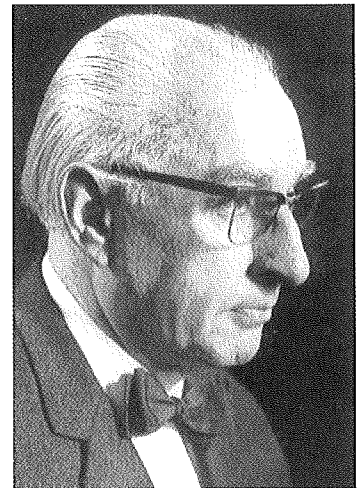


Abb. 3 Wolfgang Bargmann, 1906-1978

vereint in sich die Eigenschaften von Drüsen- und Nervenzellen und stellt somit ein Bindeglied zwischen dem Zentralnervensystem und dem endokrinen Apparat dar.

Rückblick

Die Entwicklung der Neuroendokrinologie beginnt 1927 im Laboratorium des späteren Nobelpreisträgers Karl von Frisch am Zoologischen Institut der Universität München. Ernst Scharrer (Abb. 1), mit einer Arbeit über die Lichtempfindlichkeit bzw. mit dem belichtungsabhängigen Farbwechsel der Elritze, einer Knochenfischart, beschäftigt, beobachtete im Hypothalamus dieses Fisches eigenartige, mit tropfigen Material angefüllte Nervenzellen. Sie liegen in einem umschriebenen Kerngebiet, dem Nucleus praeopticus magnocellularis. Dieses Areal entspricht den Kerngebieten im Hypothalamus der Säugetiere, Vögel und Reptilien, also den Nuclei supraoptici und paraventriculares, die heute als Bildungsorte für Vasopressin und Oxytocin und eng verwandte Nonapeptide, z. B. Vasotocin und Mesotocin, feststehen. Er deutete dieses Phänomen bereits in seiner ersten Veröffentlichung 1928 als Ausdruck einer inneren Sekretion, wofür auch die reiche Vaskularisation und mancherlei Zusammenhänge mit der Hirnanhangsdrüse zu sprechen schienen (Scharrer E 1928). In zahlreichen weiteren vergleichenden Studien konnten dann Ernst und Berta Scharrer (Abb. 2) in kongenialer Arbeitsgemeinschaft ein System von sekretorischen Nervenzellen nicht nur im Zwischenhirn niederer Wirbeltiere, sondern auch in dem von Säugern einschließlich des Menschen nachweisen. Auf dieser Grundlage formulierten sie 1937 ein umfassendes biologisches Konzept der Neurosekretion, das sich als äußerst fruchtbar erwies und noch heute Gültigkeit hat (Scharrer E und Scharrer B 1937).

Die Vorstellung über sekretorisch tätige Nervenzellen stieß damals auf erheblichen Widerstand, ja sogar auf strikte Ablehnung. Die in mikroskopischen Präparaten sichtbaren Sekrettröpfchen seien als postmortale Kunstprodukte oder als Zeichen krankhafter Prozesse zu deuten, wurde argumentiert. Diese Ansichten waren geprägt von dem seinerzeit vorherrschenden, klassischen Verständnis der Nervenzellen als ein ausschließlich Erregung bildendes und Erregung leitendes Element. Auch die seinerzeit gängige konzeptuelle Trennung zwischen den beiden Integrationssystemen, nämlich dem Nervensystem einerseits und dem endokrinen System andererseits, bildete ein erhebliches Hindernis für das Konzept der Neurosekretion. Noch in den 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts gab es Histologen und Hirnforscher, für die eine sekretorische Funktion von Nervenzellen einfach unvorstellbar war. Ernst und Berta Scharrer ließen sich jedoch nicht beirren und vertraten ihr Konzept beharrlich, konnten sie doch auf

eine breite vergleichende Basis ihrer Untersuchungen und auf das Studium von Analogien, also auf den Vergleich funktionell entsprechender Organsysteme verweisen. Gerade die Untersuchung zahlreicher Wirbeltierarten zeigte das konstante Vorkommen sekretorischer Neurone in den hypothalamischen Kernen. Völlig identische Bilder fand Berta Scharrer bei einer großen Anzahl verschiedener Arten von Wirbellosen. Sie schreibt im Jahr 1937: „Die bisherigen Befunde an Wirbellosen stimmen bis in Einzelheiten mit den an Wirbeltieren von E. Scharrer erhobenen überein (die beiden Eheleute hatten das Tierreich unter sich aufgeteilt. Ernst Scharrer studierte die Wirbeltiere, während sich die Untersuchungen von Berta Scharrer auf die Analysen von Wirbellosen konzentrierten). Es sieht beinahe so aus, als ob an irgendeiner Stelle des Zentralnervensystems bei jeder Tierart Drüsen-Nervenzellen zu finden seien. Wir können auf Grund der bisher gewonnenen Ergebnisse schon sagen, dass die Neurosekretion eine allgemeine Eigenschaft des Nervensystems der Wirbellosen wie der Wirbeltiere ist“ (Scharrer B 1937).

Der morphologische Nachweis eines Sekrettransportes von den neurosekretorischen Zellen zu den Abgabeorten in zirkulierende Körperflüssigkeiten stieß allerdings auf methodische Schwierigkeiten, denn um die Bedeutung der Neurosekretion richtig zu verstehen, war es notwendig zu wissen, auf welchem Wege die Sekrete die Zellen verlassen und wohin sie anschließend gelangen. Direkt in die Blutbahn? Dafür sprach die hohe Kapillardichte in unmittelbarer Nähe der Perikaryen sekretorischer Nervenzellen. Abgabe des Sekretes in den dritten Ventrikel, also in den Liquor cerebrospinalis? Darauf deutete die topographische Lage der Kerngebiete dicht unter der Wand des dritten Ventrikels hin. Als dritte Möglichkeit kam die Abwanderung des Sekretes in den axonalen Fortsätzen neurosekretorischer Nervenzellen in Betracht. Für eine solche Annahme sprachen histologische Bilder, die die Sekretkörnchen entlang der Nervenfasern zeigten. Da gelang es 1949 Wolfgang Bargmann „durch elektive Hervorhebung der Sekret führenden Neurone“ mit der von Gomori für den Inselapparat entwickelten Chromalaun-Hämatoxylin-Phloxin-Färbung die „neurosekretorische Bahn des Hundes in ihrer ganzen Länge, bis in den Hinterlappen der Hypophyse zu verfolgen“ (Bargmann 1949). Diese Arbeit, die weltweit bekannt wurde und noch heute zitiert wird, bildete den Anfang einer langen Reihe von Untersuchungen zu den Problemen der Neurosekretion, an denen bald zahlreiche Schüler und Mitarbeiter (Hild, Kratzsch, Ortman, Schiebeler, Zetler) Bargmanns beteiligt waren. Es gelang, durch Durchschneidung des Hypophysenstiels die Transporthypothese zu sichern, durch Durstversuche experimentell einen Zusammenhang zwischen Neurosekretmen-

Fraxiparin® 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0

Wirkstoff: Nadroparin-Calcium. **Zusammen-**

setzung: 0,2 ml/0,3 ml/0,4 ml/0,6 ml/0,8 ml/

1,0 ml Injektionslösung enthalten: 1.900/2.850/

3.800/5.700/7.600/9.500 I.E. AXa Nadroparin-

Calcium (entsprechend 95-130 I.E. AXa/mg).

Sonstige Bestandteile: Calciumhydroxid/Salzsäure

10 % (zur pH-Einstellung), Wasser für Injektions-

zwecke. Anwendungsgebiete: Perioperative Thrombo-
prophylaxe: a) Peri- und postoperative Primär-
prophylaxe tiefer Venenthrombosen bei Patienten mit
niedrigem oder mittlerem thromboembolischem Risiko
(z.B. Allgemeinchirurgie). b) Peri- und postoperative
Primärprophylaxe tiefer Venenthrombosen bei Patienten
mit hohem thromboembolischem Risiko (z. B. orthopä-
dische Chirurgie, wie z.B. Hüftersatzchirurgie). Therapie
tiefer Venenthrombose. Thromboseprophylaxe und Ge-
rinnungshemmung bei extrakorporalem Kreislauf
während der Hämodialyse und Hämofiltration. **Gegen-**

sanofi~synthelabo

anzeigen: Über-
empfindlichkeit
gegen Nadro-
parin-Calcium

und/oder Heparin, aktuelle oder aus der Anamnese be-
kannte heparinassoziierte Thrombozytopenie (Typ II),
akute Magen-Darm-Geschwüre, zerebrale Blutungen und
zerebrales Aneurysma, schwere Gerinnungsstörungen
(hämorrhagische Diathese, Mangel an Gerinnungs-
faktoren, schwere Thrombozytopenie), schwerer unkon-
trollierbarer Bluthochdruck, schwere Beeinträchtigung
der Leberfunktion, schwere Beeinträchtigung der
Nierenfunktion bei Patienten, die nicht wegen
Hämodialyse behandelt werden, akute infektiöse
Endokarditis, Verletzungen und operative Eingriffe am
Zentralnervensystem sowie am Auge und Ohr, intra-
okulare Blutungen oder andere aktive Blutungsprozesse,
Retinopathien, Glaskörperblutungen, Abortus immi-
nens, bei der Behandlung von tiefer Venenthrombose:
Regionalanästhesie. **Nebenwirkungen:** Bei etwa 3 %

der prophylaktisch behandelten Patienten traten Neben-
wirkungen auf. Häufig (> 1 %): Allgemein: Subkutane
Hämatome an der Injektionsstelle. Offene oder ver-
steckte Blutungskomplikationen (insbesondere an Haut,
Schleimhäuten, Wunden sowie im Bereich des
Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes). Anstieg der
Serum-Kalium-Konzentration. Anstieg der Aminotrans-
ferase-, Gamma-GT-, LDH- und Lipase-Konzentration.
Gelegentlich (> 0,1 % und < 1 %): Leichte, vorüber-
gehende Thrombozytopenie (Typ I). Selten (< 0,1 %): All-
gemein: allergische Reaktionen mit Symptomen wie
Übelkeit, Erbrechen, Temperaturanstieg, Kopfschmer-
zen, Urtikaria, Pruritus, Dyspnoe, Bronchospasmen,
Blutdruckabfall; Hautnekrosen an der Injektionsstelle,
anaphylaktoide Reaktionen, anaphylaktischer Schock,
vorübergehender Haarausfall, Antikörper-vermittelte
schwere Thrombozytopenie (Typ II). Endokrines System:
reversibler Hypoadosteronismus. Leber: Transaminasen-
anstieg auf das 3- bis 5fache des Normalwertes, nor-
malerweise vorübergehend. Fälle von Priapismus wur-
den berichtet. Fälle von schweren unerwünschten
Arzneimittelwirkungen, wie z.B. intrakranielle Blutungen
und Augenblutungen, wurden ebenfalls berichtet.
Peridurale Blutungen im Lumbalbereich nach Katheter-
Spinalanästhesie, die zu Paraplegie führten, wurden
beobachtet. **Hinweis:** Kontrollen der Thrombozytenzahl
sollten regelmäßig durchgeführt werden (siehe
Gebrauchsinformation). Verschreibungspflichtig.

Sanofi~Synthelabo GmbH, 10898 Berlin

Packungsgrößen: Packungen mit 10 Fertigspritzen
(N1) für Fraxiparin 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; Packungen
mit 20 Fertigspritzen (N2) für Fraxiparin 0,3; 0,6; 0,8;
Klinikpackungen. Stand: April 2000.



GRÜNER WIRD 'S NICHT!

Das fortschrittliche Leistungsspektrum

- Postoperative Thromboembolie-
prophylaxe in allen Risikobereichen
- Stationäre und ambulante Therapie
der tiefen Venenthrombose
- Gerinnungshemmung bei
Hämodialyse und Hämofiltration
- Einfache Dosierentscheidung nach
klaren Kriterien
- Innovative Sicherheitsspritze für
einfache und sichere Anwendung

Fraxiparin®

Das Menschenmögliche

ge und Wasserhaushalt festzustellen und durch pharmakologische Experimente den Nachweis zu führen, dass nur solche Areale des Hypothalamus Oxytocin und Vasopressin enthalten, in denen im histologischen Schnitt Neurosekret färbereich dargestellt werden kann (Hild und Zetler 1953). So konnte am Kieler Institut die schon in der ersten Arbeit von Bargmann vertretene Ansicht erhärtet werden, dass die Hormone Oxytocin und Vasopressin in den großzelligen Kerngebieten des Hypothalamus gebildet, in den Fasern des Tractus supraoptico-hypophysialis in den Hinterlappen transportiert, dort gestapelt und schließlich von hier aus an das Blut abgegeben werden. Einzelheiten dieser bahnbrechenden Entdeckung, den Gedanken „an eine Beziehung des neurosekretorischen hypothalamischen-hypophysären Systems zur Absonderung des antidiuretischen Hormons“ und den eleganten experimentellen Beweis für die Richtigkeit dieser These hat Wolfgang Bargmann 1975 in einer Erinnerungsskizze geschildert.

1950 vereinigten sich Bargmann und E. und B. Scharer zu einer gemeinsamen Definition des Phänomens der Neurosekretion, womit das Ziel der klassischen Neurosekretionsforschung im Wesentlichen erreicht war. Neue zytologische Aspekte ergaben sich schließlich aus der Elektronenmikroskopie, die von Bargmann – wie auch von Ernst und Berta Scharer – schon Mitte der 50er Jahre in ihr weiteres Forschungsprogramm aufgenommen wurde. Es gelang jetzt, Elementargranula des Neurosekrets darzustellen und zu zeigen, dass sie unter Mitwirkung des Proteinsyntheseparameters der Zelle entstehen und im Golgi-Apparat ihre endgültige granuläre Form erhalten. Darüber hinaus wurde es möglich, die neurosekretorische Axonendigung und den Mechanismus der Neurosekretabgabe ultrastrukturell zu studieren.

Es folgte eine geradezu stürmische Weiterentwicklung und Ausweitung dieses Gebietes, charakterisiert durch die elektive histochemische Darstellung von aminergen Systemen und die Erforschung von circumventriculären Organen, deren Bezeichnung auf einen Vorschlag von Bargmann zurückgeht.

Ungeklärt blieben in den 50er Jahren allerdings die Beziehungen zwischen Hypothalamus und dem Hypophysenvorderlappen, da das hypothalamo-infundibuläre System mit der Gomori-Methode nicht markiert werden kann. Umso weitsichtiger erscheinen die Vermutungen und Hypothesen Scharers zu diesem Themenkomplex (Scharer E 1954): „Es bestehen mannigfache Anhaltspunkte dafür, dass im Hypothalamus gebildete Wirkstoffe auf dem Weg über den hypothalamo-hypophysären Pfortaderkreislauf in den Vorderlappen gelangen. Man könnte sich vorstellen, dass die im Hypophysenstiel (also im Infundibulum) endigenden Fasern Neurosekret an die Blutgefäße abgeben, die es

auf dem Wege über die Pfortadergefäße an den Hypophysenvorderlappen weiterleiten.“

Mit diesen Vorstellungen war nun aber auch die Rolle des hypothalamo-infundibulären bzw. tubero-hypophysären Systems definiert, von dem wir heute wissen, dass es „releasing“ und „inhibiting factors“ produziert, die von den Axonendigungen im Infundibulum (Eminentia mediana) in die Blutbahn sezerniert und über den Portalkreislauf der Hypophyse an die entsprechenden Empfängerzellen des Hypophysenvorderlappens transportiert werden.

Weiterentwicklung und Ausblick

Neue Methoden der Histochemie haben in den letzten Jahren zu einer rasch anwachsenden Fülle neuer morphologischer, physiologischer und biochemischer Erkenntnisse der Signalübermittlung geführt. Als Transmittersysteme fassen wir alle Neuronensysteme zusammen, die durch Bildung und Abgabe bestimmter chemischer Stoffe charakterisiert sind, die in die Erregungsübertragung eingreifen: das Acetylcholin-System, die Aminosäuren-Systeme (Glycin-, Glutamat-, γ -Aminobuttersäure-System), die Systeme der biogenen Amine (Dopamin-, Noradrenalin-, Adrenalin-, Serotonin-, Histamin-System) und die große Zahl der Neuropeptid-Systeme. Noch hat die Forschung auf dem Gebiet der Transmittersysteme erst begonnen, das vorläufige Ende auch nur einer Bestandsaufnahme ist nicht abzusehen, und die Integration der bereits zahlreichen Ergebnisse in die bisher bekannten konventionellen Strukturen des Nervensystems ist nicht lückenlos möglich. Sehr spezifische Verfahren zur Identifizierung von Stoffen sind die immunzytochemischen Verfahren, bei denen immunbiologische Erkenntnisse zur Identifizierung und Lokalisation bestimmter Proteine und anderer antigen wirkender Stoffe verwandt werden, d. h. also auch, dass die Aufklärung des chemischen Charakters verschiedener Neuropeptide es ermöglicht, die sie bildenden Neurone immunzytochemisch darzustellen. Die Zahl der biochemisch identifizierten Neuropeptide wächst ständig und die immunzytochemischen Untersuchungen deckten Neurone auf, die nicht auf den Hypothalamus beschränkt bleiben.

Eine wesentliche Erkenntnis liegt zudem darin, dass autonome Elemente in der Darmwand und des Herzens Neuropeptide synthetisieren, wo sie als endokrine oder parakrine Botenstoffe wirken, d. h. den Charakter von Neuromodularen haben. Dieser periphere neurosekretorische Apparat wird heute unter dem Begriff „Diffuses Neuroendokrines System“ zusammengefasst. Bemerkenswert ist schließlich auch die Tatsache, dass nicht nur das Nervensystem und das Endokrinum, sondern auch das Immunsystem an neuroendokrinen Steuerungsvorgängen beteiligt ist (Scharer et al. 1994). Letztendlich haben molekularbiologisch ausgerichtete

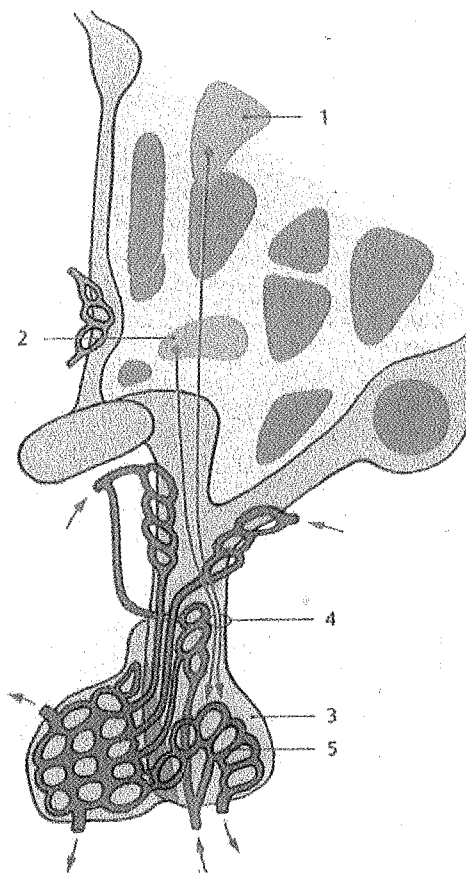


Abb. 4 Hypothalamus-Neurohypophysen-System (Schema aus Fritsch und Kühnel 2001) 1-Nucleus paraventricularis, 2-Nucleus supraopticus, 3-Hypophysenhinterlappen (Neurohypophyse), 4-Tractus hypothalamo-hypophysialis, 5-Kapillarnetz der Neurohypophyse

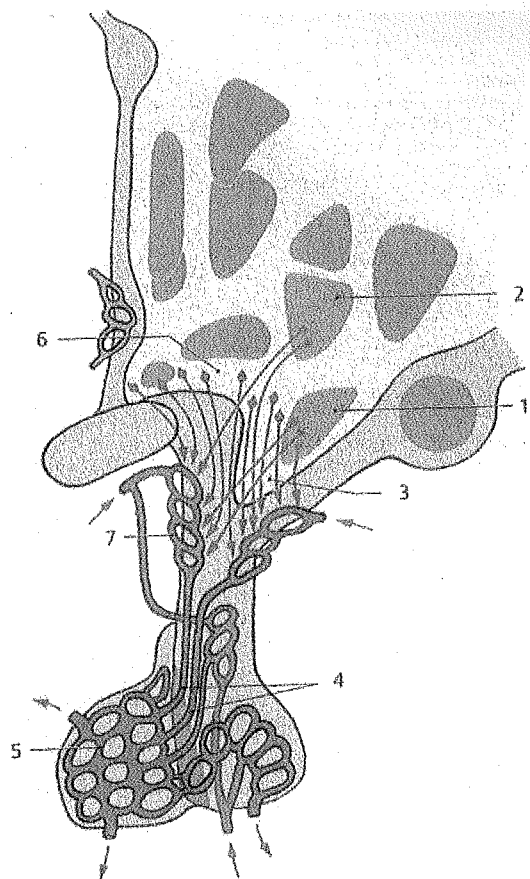


Abb. 5 Hypothalamus-Adenohypophysen-System (Schema aus Fritsch und Kühnel 2001) 1-Nucleus infundibularis, 2-Nucleus ventromedialis, 3-Tractus tuberoinfundibularis, 4-Portalgefäße, 5-Kapillarnetz der Adenohypophyse, 6-periventriculäres Areal des Hypothalamus, 7-Kapillaren in der Eminentia mediana

Studien der letzten Zeit wesentlich zum Verständnis des sekretorischen Elementarprozesses peptiderger Neurone beigetragen, und es ist zu erwarten, dass noch ein weites molekularbiologisches Feld vor uns liegt, dessen Bearbeitung fundamentale Erkenntnisse über die Natur sekretorischer Nervenzellen bringen wird.

Fazit

Aus diesen kurzen Ausführungen wird deutlich, dass wir das Konzept der Neurosekretion und der Neuroendokrinologie morphologischen Untersuchungen zu verdanken haben.

Überblickt man die Reihe der Veröffentlichungen Ernst und Berta Scharrers und die Wolfgang Bargmanns, so

fallen einmal Studien über das Nervensystem von Invertebraten auf, darunter auch mustergültige elektronenmikroskopische Arbeiten. Vor allem aber wird das Bestreben der Eheleute Scharrer deutlich, die in jahrzehntelanger Forschung erarbeiteten Ergebnisse und Erfahrungen zusammenschauend in großen Überblicken zu verknüpfen. So sei an die Formulierung von „General concepts“ über Foto-Neuro-Endokrine Systeme (1964) erinnert. Hier werden die morphologischen und funktionellen Beziehungen des neurosekretorischen Zwischenhirn-Hypophysensystems zur Umwelt, insbesondere seine Reaktion auf Lichtreize, in erstaunlicher Kürze und Präzision meisterhaft behandelt. Die Summe der Erkenntnisse und Erfahrungen zieht Ernst und Berta Scharrers meisterhaftes Buch „Neuroendo-

crinology“ (1963), in der Neurologie und Endokrinologie – lange Zeit getrennte Bereiche – zu einer interdisziplinären biologischen Wissenschaft vereint werden, die den Bogen von den Invertebraten bis zum gesunden und kranken Menschen spannt. Mit Recht gelten Ernst und Berta Scharrer in Zusammenarbeit mit Wolfgang Bargmann als Pioniere der Neuroendokrinologie.

Literatur

1. Bargmann W (1949) Über die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse. *Z Zellforsch* 34: 610-634
2. Bargmann W (1975) A marvellous region. In: Meites J, Donovan BT, McCann SM (eds) *Pioneers in Neuroendocrinology*. Plenum Press, New York-London, pp 35-43
3. Bargmann W, Lindner E, Andres K (1967) Über Synapsen an endokrinen Epithelzellen und die Definition sekretorischer Neurone. Untersuchungen am Zwischenlappen der Katzenhypophyse. *Z Zellforsch* 77: 232-298
4. Fritsch H, Kühnel W (2001) *Taschenatlas der Anatomie, Band 2, Innere Organe*. Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York
5. Gersch M, Richter K (1981) *Das peptiderge Neuron*. VEB Gustav Fischer Verlag Jena
6. Golding DW, Whittle AC (1977) Neurosecretion and related phenomena in annelids. *Intern Rev Cytol Suppl* 5: 189-302
7. Guillemin R (1978) Rede anlässlich der Verleihung des Nobelpreises 1977. Vgl Bericht von Karcher HL, *Selecta* 25: 2318
8. Hild W, Zetler G (1953) Experimenteller Beweis für die Entstehung der sogenannten Hypophysenhinterlappenhormone im Zwischenhirn. *Pflügers Arch* 257: 169-201
9. Lentz TL (1968) *Primitive Nervous Systems*. Yale University Press, New Haven Conn.
10. Oksche A (1985) Peptiderge Nervenzellen: Hormonale und nervöse Kommunikation. *Verh Ges Deut Naturforsch Ärzte*, 113. Vers Nürnberg 1984. Wiss Verlagsges mbH, Stuttgart, pp 383-402
11. Scharrer B (1937) Über sekretorisch tätige Nervenzellen bei wirbellosen Tieren. *Naturwissenschaften* 25: 131-138
12. Scharrer B (1979) Neurosecretion and neuroendocrinology in historical perspective. *Hormonal Proteins and Peptides* 7: 279-292
13. Scharrer B (1987) Neurosecretion: beginnings and new directions in neuropeptide research. *Ann Rev Neurosci* 10: 1-17
14. Scharrer B, Smith EM, Stefano GB (1994) *Neuropeptides and immunoregulation*. Springer, Berlin, pp 1-174
15. Scharrer E (1928) Die Lichtempfindlichkeit blinder Elritzen. Untersuchungen über das Zwischenhirn der Fische I. *Z vergl Physiol* 7: 1-38
16. Scharrer E (1954) Das Hypophysen-Zwischenhirnsystem der Wirbeltiere. *Anat Anz (Suppl)* 100: 5-29
17. Scharrer E (1964) Photo-neuro-endocrine systems: General concepts. *Ann NY Acad Sci* 117: 13-22
18. Scharrer E, Scharrer B (1937) Über Drüsen-Nervenzellen und neurosekretorische Organe bei Wirbellosen und Wirbeltieren. *Biol Rev* 12: 185-216
19. Scharrer E, Scharrer B (1963) *Neuroendocrinology*. Columbia Univ Press, New York, pp 1-289

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (Direktor: Prof. Dr. P. Dominiak) der Medizinischen Universität zu Lübeck

Geschlechtsspezifische Expression der Präpro-Orexin und Orexin-Rezeptor mRNA in peripheren Organen der Ratte

O. Jöhren, S. J. Neidert, M. Kummer und P. Dominiak

Summary

The recently discovered neuropeptides orexin A and B are produced by neurons located in the lateral hypothalamus and regulate energy balance, endocrine functions and sleeping behavior. In the present study we analyzed the expression of the orexin receptor subtypes OX_1 and OX_2 in peripheral tissues of male and female rats by quantitative real-time PCR. Beside the high levels in the brain we detected OX_1 receptor mRNA in the pituitary, adrenal and thyroid glands, and in kidney, testis, and jejunum. Very high amounts of OX_2 receptor mRNA were found in adrenal glands of male rats. Low OX_2 receptor mRNA levels were present in the lung and pituitary gland. In the adrenal gland, the OX_2 receptor mRNA was confined to the zona glomerulosa and reticularis as indicated by *in situ* hybridization. OX_1 receptor mRNA in the pituitary and OX_2 receptor mRNA in the adrenal gland was significantly lower in female rats when compared to male rats. In the hypothalamus, OX_1 receptor mRNA was slightly elevated in female rats. The expression of orexin receptor subtypes in peripheral organs indicates peripheral effects of orexins and the existence of a peripheral orexin-system. Moreover, the gender differences in the expression of OX_1 and OX_2 receptors in hypothalamus, pituitary and adrenal glands suggests gender-specific roles of orexins in the control of endocrine functions.

Zusammenfassung

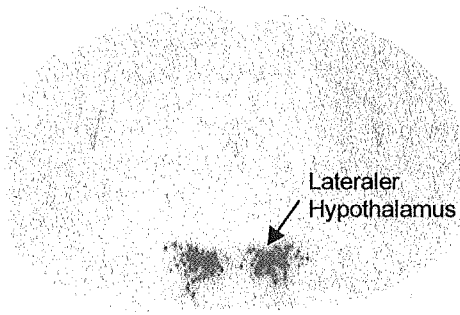
Die kürzlich entdeckten Neuropeptide Orexin A und Orexin B werden in Neuronen des lateralen Hypothalamus synthetisiert und regulieren die Energiehomöostase, endokrine Funktionen sowie Schlaf-Wachverhalten. In der vorliegenden Studie wurde die mRNA Expression der Orexin-Rezeptor Subtypen OX_1 und OX_2 in peripheren Organen männlicher und weiblicher Ratten mittels quantitativer „real-time“ PCR untersucht. Neben dem hohen Gehalt im Gehirn konnten wir OX_1 -Rezeptor mRNA in Hypophyse, Nebennieren, Schilddrüse, Niere, Testes und Jejunum nachweisen.

Sehr hohe Mengen an OX_2 -Rezeptor mRNA wurden in den Nebennieren männlicher Ratten gefunden. Niedrige OX_2 -Rezeptor mRNA Spiegel waren in Lunge und Hypophyse präsent. In den Nebennieren wurde die OX_2 -Rezeptor mRNA in der Zona glomerulosa und Zona reticularis mittels *in situ* Hybridisierung lokalisiert. Im Vergleich zu männlichen Ratten war der OX_1 -Rezeptor mRNA Gehalt in den Hypophysen und der OX_2 -Rezeptor mRNA Gehalt in den Nebennieren weiblicher Ratten deutlich erniedrigt. Im Hypothalamus weiblicher Ratten waren die OX_1 -Rezeptor mRNA Spiegel leicht erhöht. Die Expression der Orexin-Rezeptor Subtypen in peripheren Organen der Ratte deutet auf periphere Orexin-Effekte und die Existenz eines peripheren Orexin-Systems. Die Geschlechtsunterschiede in der OX_1 - und OX_2 -Rezeptor Expression in Hypothalamus, Hypophyse und Nebennieren lassen außerdem eine geschlechtsspezifische Rolle der Orexine bei der Kontrolle endokriner Funktionen vermuten.

Einleitung

Aufgrund von Sequenz-Homologien sind zahlreiche sogenannte Orphan (Weisen)-Rezeptoren isoliert worden, deren Liganden und Funktionen nicht bekannt sind. Die systematische Suche nach endogenen Liganden für G-Protein gekoppelte Orphan-Rezeptoren durch Screening von HPLC-Fractionen aus Gehirnextrakten führte zur Entdeckung der Peptide Orexin A und Orexin B und zur Klonierung der entsprechenden cDNA [25]. Orexin A und B entstehen durch proteolytische Spaltung eines gemeinsamen Vorläuferpeptides (Präpro-Orexin), dessen mRNA in großen Mengen im lateralen Hypothalamus exprimiert wird (Abb. 1) [25]. Der Name Orexin wurde vom griechischen Wort „orexis“ (für Appetit) abgeleitet, da intracerebroventriculär (i.c.v.) injiziertes Orexin die Nahrungsaufnahme stimuliert [25]. Präpro-Orexin ist identisch mit Präpro-Hypocretin, welches von einer anderen Arbeitsgruppe als Hypothalamus-spezifisches Peptid kloniert worden war [5].

A. Präpro-Orexin mRNA



B. Präpro-Orexin Struktur

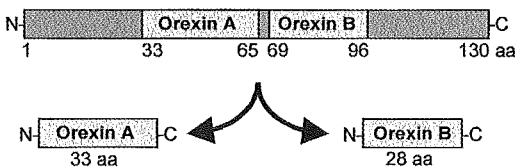


Abb. 1: Expression der Präpro-Orexin mRNA im lateralen Hypothalamus der Ratte dargestellt durch in situ Hybridisierung (A) und Peptid-Struktur des Präpro-Orexin sowie von Orexin A und Orexin B (B). aa - Aminosäuren

Die hypothalamischen Präpro-Orexin mRNA Mengen werden durch Fasten erhöht [25] und sind in genetisch adipösen Mäusen erniedrigt [36]. Insulin-induzierte Hypoglykämie aktiviert Orexin-immunpositive Neurone im lateralen Hypothalamus [19] und bewirkt eine verstärkte Präpro-Orexin mRNA-Expression [6]. Diese Befunde verdeutlichen die Rolle der Orexine bei der Kontrolle der Energiehomöostase. Interessanterweise zeigen genetisch manipulierte Mäuse, denen Orexin produzierende Neurone fehlen, trotz reduzierter Nahrungsaufnahme eine deutliche Zunahme des Körpergewichts [8]. Orexine scheinen also den Energieverbrauch stärker zu stimulieren als die Energieaufnahme. Übereinstimmend mit der Verteilung der Präpro-Orexin mRNA sind Orexin-immunpositive Neurone ausschließlich im lateralen Hypothalamus lokalisiert [5,22,25]. Orexin-immunpositive Fasern projizieren allerdings in zahlreiche Hirnregionen einschließlich verschiedener Hypothalamuskern, des Locus coeruleus, des Nucleus tractus solitarius, des Nucleus ambiguus und des Nucleus dorsalis nervi vagi [4,22]. Außerdem konnten Orexin-immunpositive Axone im Rückenmark lokalisiert werden [35]. Die mRNA-Expression der Orexin-Rezeptor-Subtypen OX_1 und OX_2 wurde in verschiedenen Kerngebieten des Rattenhirns mit-

tels in situ Hybridisierung lokalisiert [34]. Das Verteilungsmuster der OX_1 - und OX_2 -Rezeptor mRNA entspricht weitgehend der Verteilung Orexin-positiver Fasern. Sehr hohe Konzentrationen von OX_1 -Rezeptor mRNA liegen z.B. im Locus coeruleus vor, während OX_2 -Rezeptor mRNA unter anderem im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus exprimiert ist. Aufgrund der ausgedehnten Projektion Orexin enthaltender Neurone und der Verteilungsmuster der Orexin-Rezeptoren wurde von den verschiedenen Autoren postuliert, dass Orexine neben der Regulation der Energiehomöostase auch andere zentrale Funktionen wie die Regulation neuroendokriner Systeme und des autonomen Nervensystems sowie des Schlaf-Wachverhaltens kontrollieren.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass das Orexin-System eng mit der Schlafregulation verknüpft ist. Bei Mäusen und Hunden führen genetische Defekte des Präpro-Orexins bzw. des OX_2 -Rezeptors zu Narkolepsie ähnlichen Symptomen [2,14]. Narkolepsie-Patienten weisen reduzierte Orexin-Spiegel in der Zerebrospinalflüssigkeit auf und in den Gehirnen von Narkoleptikern ist die Anzahl der Orexin produzierenden Neurone stark reduziert [20,21,33]. Auch in Mäusen bewirkt eine genetisch induzierte Degeneration der Orexin produzierenden Neurone im lateralen Hypothalamus neben Übergewicht Narkolepsie [8]. Wie in diesem Tiermodell lässt sich bei Patienten mit Narkolepsie ein erhöhter „body mass“ Index (BMI) nachweisen [28]. Überdies wurden mögliche Funktionen der Orexine bei der Regulation des autonomen Nervensystems untersucht. So stimuliert Orexin die Sekretion von Magensäure, ein Effekt, der durch Vagotomie und Atropin aufgehoben wird [31]. I.c.v. injiziertes Orexin erhöht bei Ratte und Kaninchen den mittleren arteriellen Blutdruck und die Herzfrequenz [16,26,29]. Außerdem steigen nach i.c.v. Injektion von Orexin die Plasma Katecholamin-Konzentrationen und die Aktivität des renalen sympathischen Nerven an [16,29].

Neben der Kontrolle des autonomen Nerven-Systems und des Schlaf-Wachverhaltens wurde gezeigt, dass Orexine verschiedene neuroendokrine Systeme beeinflussen können. Nach i.c.v. Injektion von Orexin steigen die ACTH- und Kortikosteron-Spiegel, während die Wachstumshormon (GH)- und Prolaktin-Spiegel im Plasma sinken [7,13,24]. In weiblichen Ratten wird die Freisetzung von LH durch i.c.v. injiziertes Orexin reguliert [11,23,32], wobei der Effekt von der Progesteron- und Estradiol-Präsenz abhängig ist: In ovariectomierten Ratten hemmt Orexin die LH-Freisetzung, während in Progesteron/Estradiol vorbehandelten ovariectomierten Ratten die LH-Freisetzung stimuliert wird [23]. Dieser Effekt wird wahrscheinlich über eine Regulation des LHRH durch Orexine vermittelt, da in kultivierten Hypophysen-Zellen kein Orexin-Effekt

auf eine LH-Freisetzung beobachtet wurde [27], Orexine jedoch LHRH aus Hypothalamus-Explantaten freisetzen [24].

Neben den zentralen Orexin-Effekten wurden periphere Effekte beschrieben [15,18]. Überdies wurde Präpro-Orexin mRNA außer im ZNS in Testes, nicht jedoch in Ovarien gefunden [10]. Mit der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob Orexin-Rezeptoren in verschiedenen peripheren Organen der Ratte exprimiert sind und ob es Geschlechtsunterschiede in der Orexin-Rezeptor Expression gibt.

Material und Methoden

Versuchstiere

Es wurden männliche und weibliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 250-300 g verwendet (Charles River, Sulzfeld). Die Ratten wurden nach Pentobarbital-Narkose getötet, die Organe wurden entnommen und in Isopentan bei -30°C auf Trockeneis gefroren.

RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die Gewebe wurden in Guanidinisothiocyanat- und Mercaptoethanol-haltigen Puffer lysiert und homogenisiert. Die Gesamt-RNA wurde anschließend über Silicagelmatrix-Säulen gereinigt und mit DNase I behandelt (RNeasy Kit, Fa. Qiagen, Hilden). Erst-Strang cDNA wurde aus 1 µg RNA in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden (dNTPs), RNase Inhibitor, Oligo-(Desoxythymidin)₁₅-Primern und AMV Reverse-Transkriptase synthetisiert (Fa. Promega, Mannheim).

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Spezifische OX₁-, OX₂- und β-Aktin Primer wurden mit Hilfe der Primer 3 Software auf Basis der veröffentlichten GenBank-Sequenzen konstruiert (Tab. 1) und von der Fa. Life Technologies (Karlsruhe) synthetisiert. Die PCR wurde mit 5 µl des cDNA-Reaktionsansatzes, 500 nM Primern und der DNA Polymerase

Name	Orientierung	Position	Produkt (bp)	Gen-Bank Nr.
OX ₁	sense	1910	260	AF041244
	antisense	2169		
OX ₂	sense	1834	314	AF041246
	antisense	2147		
β-Aktin	sense	1461	380 (844) ¹	RATACCYB
	antisense	2304		

¹bei genomischer DNA

Tab. 1: PCR-Primer

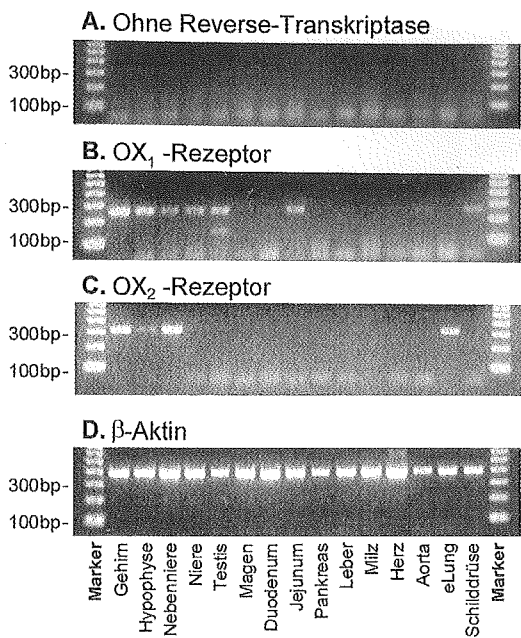


Abb. 2: Expression der OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA in Gehirn und peripheren Organen der Ratte dargestellt mittels Reverse-Transkriptase PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese.

DyNAzyme (Fa. Biometra, Göttingen) mit den entsprechenden Puffern unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 30 sec Denaturierung bei 94°C, 30 sec Primer-Hybridisierung bei 56°C und 60 sec Elongation bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Eine mögliche Verunreinigung mit genomischer DNA wurde durch Aussparen der Reversen-Transkriptase während der cDNA Synthese kontrolliert (Abb. 2A). Die Analyse der β-Aktin mRNA diente als Positiv-Kontrolle (Abb. 2D). Die PCR-Produkte wurden mit einem TA-Klonierungs-Kit (Invitrogen, Groningen, Holland) kloniert

und ihre Identität mittels Nukleotid-Sequenzanalyse bestätigt (MWG Biotech, Ebersberg).

Quantitative („real-time“) PCR

Mit der „real-time“ PCR ist eine kontinuierliche Messung des entstehenden PCR-Produkts während der linearen Phase der PCR-Reaktion und somit eine Quantifizierung der Ausgangs-cDNA

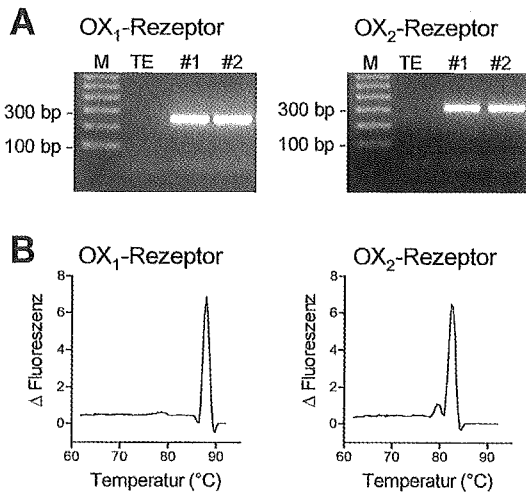


Abb. 3: Quantitative „real-time“ PCR: Agarosegel- (A) und Schmelzkurven-Analyse (B) der amplifizierten OX₁- und OX₂-Rezeptor cDNA-Fragmente.

möglich. Die „real-time“ PCR wurde auf einem GeneAmp 5700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green I durchgeführt, welcher unspezifisch in Doppelstrang-DNA interkaliert und somit in der PCR-Reaktion zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führt. Die Überprüfung der PCR-Produkt-Spezifität erfolgte nach Abschluss der PCR-Reaktion mittels Agarosegel- und Schmelzkurven-Analyse (Abb. 3). Die PCR wurde in Anwesenheit der entsprechenden Sense- und Antisense-Primer (Tab. 1), 100 ng cDNA und 1,25 U HotGoldStar DNA-Polymerase (Eurogentec, Köln) mit 40 der folgenden Zyklen durchgeführt: 15 sec Denaturierung bei 95°C, 30 sec Primer-Hybridisierung bei 56°C und 30 sec Elongation bei 60°C.

Die Quantifizierung der OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA Kopien erfolgte mit der Zyklus-Schwellenwert-Methode [9]. Mittels Verdünnungen bekannter Mengen der klonierten OX₁- bzw. OX₂-Rezeptor cDNA Fragmente wurden Standard-Kurven erstellt (Abb. 4). Die Schwellen-Wert-Zykluszahl (C_T) wurde für jede Probe mit der GeneAmp 5700 Sequence Detection System Software bei einem Fluoreszenz-Schwellenwert von 0,3 (R_n) bestimmt und die entsprechende Zahl der mRNA Kopien berechnet. Als interner Standard wurde die Anzahl der β-Aktin mRNA Kopien bestimmt [10].

In situ Hybridisierung

Die in situ Hybridisierung wurde an 16 µm Gefrierschnitten mit S³⁵-markierten OX₁- und OX₂-Rezeptor spezifischen Oligonukleotid-Sonden durchgeführt

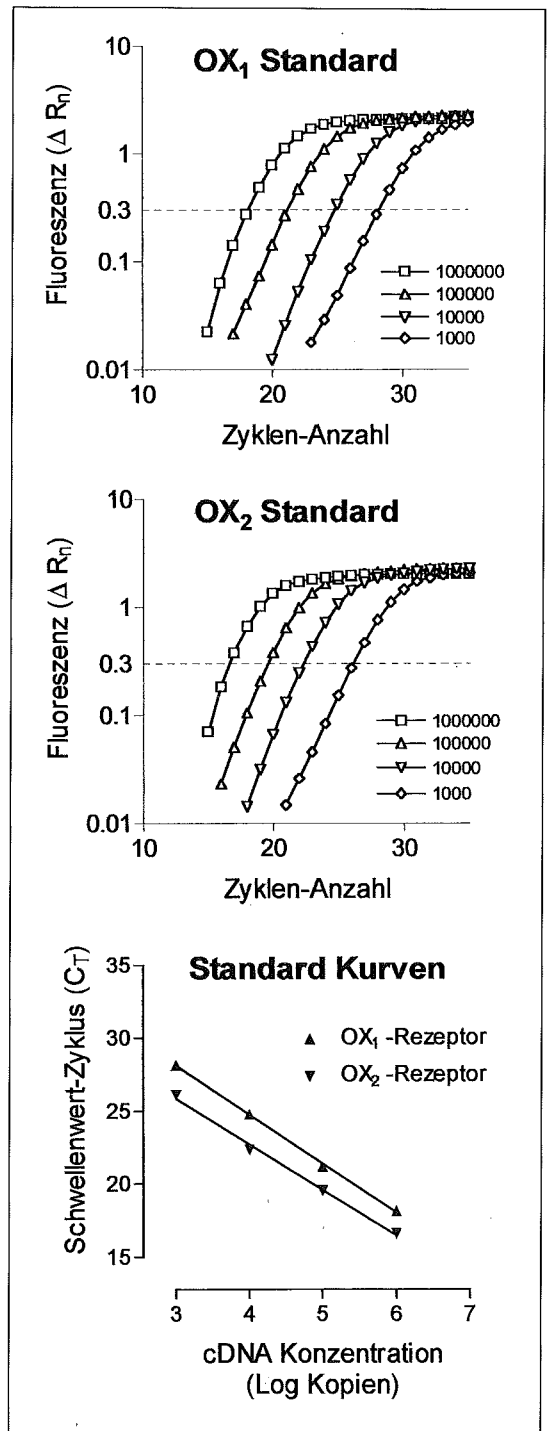


Abb. 4: Quantitative „real-time“ PCR: Amplifizierung unterschiedlicher Mengen klonierter OX₁- und OX₂-Rezeptor cDNA (angegeben ist die Anzahl der Kopien) und die daraus ermittelten Standard-Kurven.

[10]. Nach Hybridisierung der Sonden bei 42°C für 18 h und Waschen der Schnitte in NaCl-Natrium-Zitrat-Puffer wurden die Schnitte unter einem Hyperfilm ^3H (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) für 1-2 Wochen exponiert.

Ergebnisse

Expression von OX_1 - und OX_2 -Rezeptor mRNA in peripheren Organen der Ratte

OX_1 - und OX_2 -Rezeptor PCR-Produkte der erwarteten Größe wurden in verschiedenen peripheren Geweben männlicher Ratten amplifiziert (Abb. 2). OX_1 -Rezeptor-mRNA wurde in Gehirn, Hypophyse, Nebennieren, Niere, Hoden, Jejunum und Schilddrüse gefunden (Abb. 2B). OX_2 -Rezeptor-mRNA konnte in Gehirn, Nebennieren, Lunge und Hypophyse nachgewiesen werden (Abb. 2C). Keine PCR-Produkte wurden amplifiziert, wenn die PCR ohne Reverse-Transkriptase durchgeführt wurde (Abb. 2A). Kontamination mit genomischer DNA kann daher ausgeschlossen werden. Die RT-PCR Amplifizierung β -Aktin-spezifischer DNA-Fragmente zeigt die Integrität der cDNA in den untersuchten Proben (Abb. 2D).

Quantifizierung der OX_1 und OX_2 -Rezeptor mRNA mittels „real-time“ PCR

Mittels „real time“ PCR wurden einzelne DNA-Fragmente der erwarteten Größe amplifiziert (Abb. 3A). Die Spezifität der amplifizierten OX_1 - und OX_2 -Rezeptor cDNA wurde routinemäßig durch DNA-Schmelzkurven-Analyse bestätigt (Abb. 3B). Die Amplifizierung bekannter Mengen klonierter OX_1 - und OX_2 -Rezeptor cDNA war in der exponentiellen Phase der PCR über einen Bereich von 10^3 bis 10^6 Kopien möglich und diente der Erstellung von Standard-Kurven (Abb. 4). Neben den hohen Mengen an OX_1 -Rezeptor mRNA im Gehirn wurden niedrige bis moderate OX_1 -Rezeptor mRNA Mengen in Hypophyse, Nebenniere, Schilddrüse und Niere männlicher Ratten gefunden (Abb. 5A). Sehr hohe Mengen an OX_2 -Rezeptor mRNA wurden in Nebennieren gefunden (Abb. 5B). In Hypophyse und Lunge waren niedrige Mengen an OX_2 -Rezeptor mRNA präsent.

Geschlechtsspezifische Expression der Orexin-Rezeptoren

Der Gehalt an OX_1 - und OX_2 -Rezeptor mRNA wurde in Hypothalamus, Hypophyse, Nebennieren männlicher und weiblicher Ratten untersucht (Abb. 6). Im Hypothalamus weiblicher Ratten waren die OX_1 -Rezeptor mRNA Spiegel im Vergleich zu männlichen Ratten um etwa 25 % erhöht (Abb. 6). Dagegen waren die OX_1 -Rezeptor mRNA Spiegel in der Hypophyse und die OX_2 -Rezeptor mRNA Spiegel in den Nebennieren weiblicher Ratten im Vergleich zu männlichen Ratten deutlich reduziert (Abb. 6).

Lokalisierung der OX_2 -Rezeptor mRNA in Nebennieren männlicher und weiblicher Ratten

OX_2 -Rezeptor mRNA wurde in der Nebennierenrinde männlicher Ratten in der Zona glomerulosa und Zona reticularis lokalisiert (Abb. 7A). Keine signifikante Expression von Orexin-Rezeptor mRNA wurde im Nebennierenmark detektiert. In weiblichen Ratten war die OX_2 -Rezeptor mRNA Gehalt in der Nebennierenrinde im Vergleich zu männlichen Ratten deutlich reduziert (Abb. 7B).

Diskussion

Mit der vorliegenden Studie wurde die Expression der OX_1 - und OX_2 -Rezeptoren in verschiedenen peripheren Organen der Ratte nachgewiesen. Der höchste periphere OX_1 -Rezeptor mRNA Gehalt wurde in der Hypophyse gefunden, während die OX_2 -Rezeptor mRNA Spiegel in den Nebennieren am höchsten waren. Außerdem zeigten sich deutliche Unterschiede in der hypophysären und adrenalen OX_1 - und OX_2 -Rezeptor Expression zwischen männlichen und weiblichen Ratten.

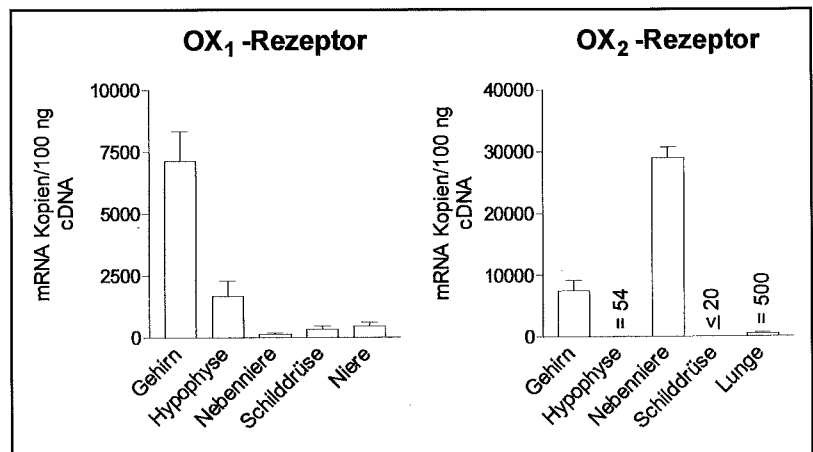


Abb. 5: Quantitative „real-time“ PCR: OX_1 - und OX_2 -Rezeptor mRNA Gehalt in Gehirn und peripheren Organen männlicher Ratten (n = 4).

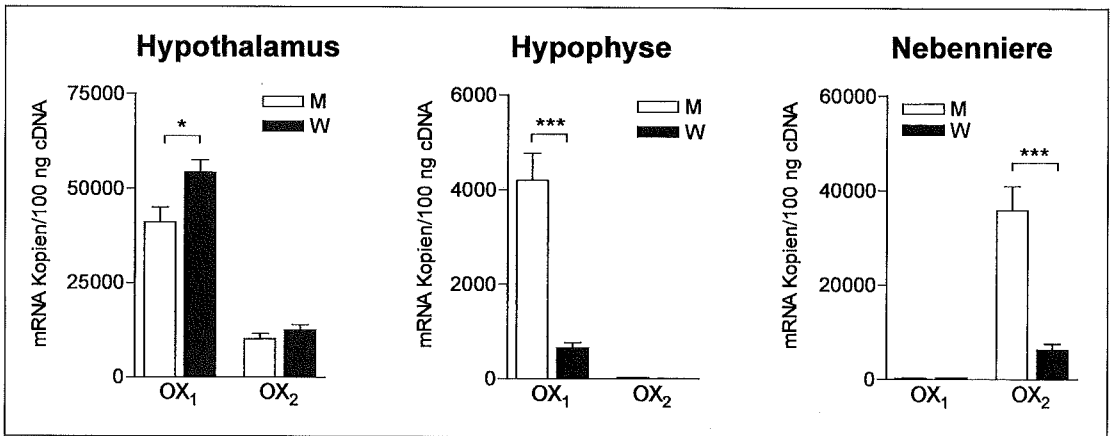


Abb. 6: OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA Expression in Hypothalamus, Hypophyse und Nebennieren männlicher (M) und weiblicher (W) Ratten (n = 8). * - $P < 0.05$, *** - $P < 0.001$.

Das Vorkommen von Orexin-Rezeptoren in Hypophyse und Nebenniere lässt auf direkte endokrine Effekte der Orexine in diesen Organen schließen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Orexin nach subkutaner Injektion bzw. an kultivierten Nebennierenrinden-Zellen bei Mensch und Ratte die Freisetzung von Kortisol stimuliert [15,17]. Diese Befunde werden durch die Lokalisierung der OX₂-Rezeptor mRNA in der Nebennierenrinde von Ratte unterstützt. Obwohl i.c.v. injiziertes Orexin die Plasma-Spiegel der hypophysären Hormone ACTH, Prolaktin, LH und GH beeinflusst [7,13], konnte ein direkter Orexin-Effekt auf die Hypophyse nur für die CRF-induzierte ACTH Freisetzung gezeigt werden [27]. Daher reguliert Orexin Plasma Prolaktin, LH und GH vermutlich über eine Beeinflussung der entsprechenden Releasing-Hormone. Auch die von Mitsuma et al. beobachtete Hemmung der TSH-Freisetzung nach intravenöser Injektion von Orexin scheint über eine Hemmung des TRH reguliert zu sein [18].

Die Rolle der OX₁-Rezeptoren in Schilddrüse und Niere und der OX₂-Rezeptoren in der Lunge ist bislang ungeklärt. Da neben der hohen Expression im lateralen Hypothalamus und einer wesentlich geringeren Expression im Ependym der Gehirnv ventrikel Präpro-Orexin mRNA in peripheren Organen bislang nur in Testes nachgewiesen werden konnte [10,12,25], ist es unwahrscheinlich, dass Orexin parakrin oder autokrin wirkt. Tatsächlich wurde Orexin im Plasma von Mensch und Ratte nachgewiesen [1,10]. Die Konzentrationen sind allerdings sehr niedrig und es konnten, obwohl Testes nicht jedoch Ovarien Orexin in geringen Mengen produzieren, keine Geschlechtsunterschiede in den Plasma Orexin-Werten gefunden werden [1,10]. Orexin-haltige Neurone projizieren zur Eminentia me-

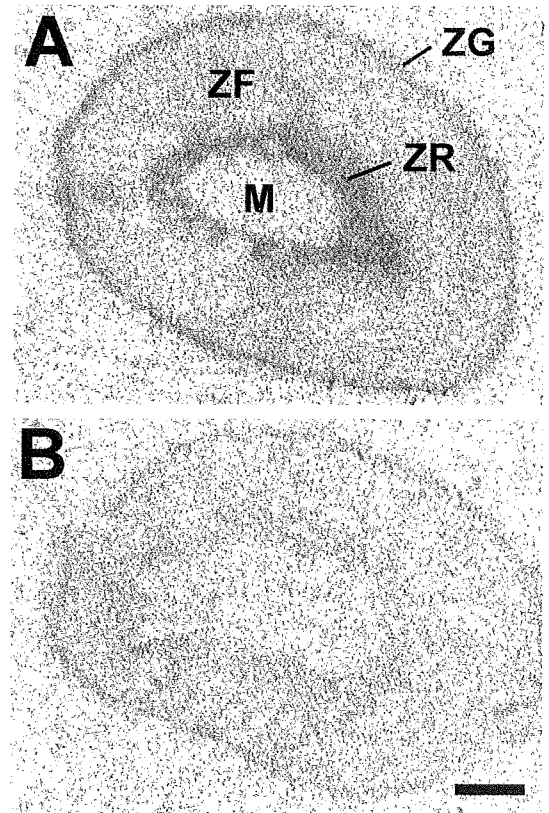


Abb. 7: Lokalisierung von OX₂-Rezeptor mRNA in den Nebennieren männlicher (A) und weiblicher (B) Ratten mittels in situ Hybridisierung. M - Mark, ZG - Zona glomerulosa, ZF - Zona fasciculata, ZR - Zona reticularis, Balken in B - 1 mm.

diana sowie zur Hypophyse und könnten so ebenfalls zu den Plasma Orexin-Spiegeln beitragen [3].

Die unterschiedliche Expression von OX_1 - und OX_2 -Rezeptor mRNA in Hypothalamus sowie Hypophyse und Nebennieren männlicher und weiblicher Ratten deutet auf eine geschlechtsspezifische Regulation der Orexin-Rezeptoren, welche durch gonadale Steroide bedingt sein könnte. Interessanterweise sind die Orexin A Spiegel im Hypothalamus weiblicher Ratten im Vergleich zu männlichen Ratten erhöht [30] und der Effekt von Orexin auf die Sekretion von LH hängt von der Anwesenheit ovarieller Steroidhormone ab [23]. Orexine könnten eine geschlechtsspezifische Rolle bei der Kontrolle spezifischer endokriner Funktionen aber auch bei der Regulation der Energiehomöostase spielen. Künftige Arbeiten werden klären, inwieweit Orexin-Rezeptoren durch gonadale Steroidhormone reguliert werden und welche Rolle dies bei der Kontrolle der verschiedenen durch Orexin beeinflussten endokrinen und physiologischen Systeme spielt.

Danksagung

Die Autoren danken Herrn Prof. Dr. G. Sczakiel (Institut für Molekulare Medizin, Universitätsklinik Lübeck) für die Möglichkeit, das GeneAmp 5700 Sequence Detection System zu benutzen.

Literatur

- Arihara Z, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Sone M, Satoh F, Ito S, Mouri T (2001) Immunoreactive orexin-A in human plasma. *Peptides* 22: 139-142
- Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M (1999) Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98: 437-451
- Date Y, Mondal MS, Matsukura S, Ueta Y, Yamashita H, Kaiya H, Kangawa K, Nakazato M (2000) Distribution of orexin/hypocretin in the rat median eminence and pituitary. *Brain Res Mol Brain Res* 76: 1-6
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 748-753
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 322-327
- Griffond B, Risold PY, Jacquemard C, Colard C, Fellmann D (1999) Insulin-induced hypoglycemia increases preprohypocretin (orexin) mRNA in the rat lateral hypothalamic area. *Neurosci Lett* 262: 77-80
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10911-10916
- Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30: 345-354
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11: 1026-1030
- Jöhren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P (2001) Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* 142: 3324-3331
- Kohsaka A, Watanobe H, Kakizaki Y, Suda T, Schiöth HB (2001) A significant participation of orexin-A, a potent orexigenic peptide, in the preovulatory luteinizing hormone and prolactin surges in the rat. *Brain Res* 898: 166-170
- Kummer M, Neidert SJ, Jöhren O, Dominiak P (2001) Orexin (hypocretin) gene expression in rat ependymal cells. *Neuroreport* 12: 2117-2120
- Kuru M, Ueta Y, Serino R, Nakazato M, Yamamoto Y, Shibuya I, Yamashita H (2000) Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport* 11: 1977-1980
- Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E (1999) The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98: 365-376
- Malendowicz LK, Tortorella C, Nussdorfer GG (1999) Orexins stimulate corticosterone secretion of rat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Steroid Biochem Mol Biol* 70: 185-188
- Matsumura K, Tsuchihashi T, Abe I (2001) Central orexin-A augments sympathoadrenal outflow in conscious rabbits. *Hypertension* 37: 1382-1387
- Mazzocchi G, Malendowicz LK, Gottardo L, Aragona F, Nussdorfer GG (2001) Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 778-782
- Mitsuma T, Hirooka Y, Mori Y, Kayama M, Adachi K, Rhue N, Ping J, Nogimori T (1999) Effects of orexin A on thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin secretion in rats. *Horm Metab Res* 31: 606-609
- Moriguchi T, Sakurai T, Nambu T, Yanagisawa M, Goto K (1999) Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neurosci Lett* 264: 101-104
- Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E (2000) Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 355: 39-40
- Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, Li R, Hungs M, Pedrazzoli M, Padigaru M, Kucherlapati M, Fan J, Maki R, Lammers GJ, Bouras C, Kucherlapati R, Nishino S, Mignot E (2000) A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* 6: 991-997
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin

- (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18: 9996-10015
23. Pu S, Jain MR, Kalra PS, Kalra SP (1998) Orexins, a novel family of hypothalamic neuropeptides, modulate pituitary luteinizing hormone secretion in an ovarian steroid-dependent manner. *Regul Pept* 78: 133-136
 24. Russell SH, Kim MS, Small CJ, Abbott CR, Morgan DG, Taheri S, Murphy KG, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR (2000) Central administration of orexin A suppresses basal and domperidone stimulated plasma prolactin. *J Neuroendocrinol* 12: 1213-1218
 25. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92: 573-585
 26. Samson WK, Gosnell B, Chang JK, Resch ZT, Murphy TC (1999) Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. *Brain Res* 831: 248-253
 27. Samson WK, Taylor MM (2001) Hypocretin/orexin suppresses corticotroph responsiveness in vitro. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R1140-R1145
 28. Schuld A, Hebebrand J, Geller F, Pollmacher T (2000) Increased body-mass index in patients with narcolepsy. *Lancet* 355: 1274-1275
 29. Shirasaka T, Nakazato M, Matsukura S, Takasaki M, Kannan H (1999) Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *Am J Physiol* 277: R1780-R1785
 30. Taheri S, Mahmoodei M, Opacka-Juffry J, Ghatei MA, Bloom SR (1999) Distribution and quantification of immunoreactive orexin A in rat tissues. *FEBS Lett* 457: 157-161
 31. Takahashi N, Okumura T, Yamada H, Kohgo Y (1999) Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats. *Biochem Biophys Res Commun* 254: 623-627
 32. Tamura T, Irahara M, Tezuka M, Kiyokawa M, Aono T (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic neuropeptides, suppress the pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized female rats. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 759-762
 33. Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM (2000) Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 27: 469-474
 34. Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM (1998) Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 438: 71-75
 35. van den Pol AN (1999) Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. *J Neurosci* 19: 3171-3182
 36. Yamamoto Y, Ueta Y, Date Y, Nakazato M, Hara Y, Serino R, Nomura M, Shibuya I, Matsukura S, Yamashita H (1999) Down regulation of the prepro-orexin gene expression in genetically obese mice. *Brain Res Mol Brain Res* 65: 14-22

Möglichkeiten der Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophyse-Ovar (HPO)-Achse durch GnRH-Analoga in der Gynäkologie

R. Felberbaum und K. Diedrich

Wirkprinzip/Grundlagen

Das Gonadotrophin-Releasing-Hormon (GnRH), ein aus zehn Aminosäuren bestehendes Peptidhormon, in pulsativer Form von den Kerngebieten des mediobasalen Hypothalamus sezerniert, spielt die zentrale Rolle im Kontrollmechanismus des menstruellen Zyklus der erwachsenen Frau. GnRH bindet an die membranständigen GnRH-Rezeptoren der gonadotropen Zellen der Adenohypophyse und initiiert hier eine gleichfalls pulsatile Sekretion der Gonadotropine Follikel stimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH), die die Follikelreifung und Sexualsteroidbiosynthese im Ovar steuern, wobei diese Hypothalamo-Hypophysär-Ovarielle(HPO)-Achse über zahlreiche positive und negative „feed back“-Mechanismen verfügt.

Nach der erfolgreichen Charakterisierung und Syntheseisierung des GnRH-Moleküls wurde das Dekapeptid mit dem Ziel, eine solche Substanz therapeutisch einsetzen zu können, strukturell modifiziert, um eine höhere Rezeptorbindungsaffinität an den gonadotropen Zellen der Adenohypophyse zu schaffen und um einen raschen enzymatischen Abbau zu verhindern. Die vorgenommenen Veränderungen betrafen überwiegend die Positionen 6 und 10 der Aminosäuresequenz, in die unnatürliche D-Aminosäuren integriert wurden, wie z. B. D-Serin, D-Tryptophan, D-Leucin und D-Glycin. Die Position 10 wurde zum Teil ganz eliminiert oder durch Ethylamid- oder Aza-Gruppen ergänzt. Der GnRH-Agonist hat eine 100-200fach höhere Affinität zu den GnRH-Rezeptoren als das natürliche Peptid. Es kommt zunächst zu einer vermehrten Ausschüttung der FSH- und LH-Speicher und zu einer vorübergehenden Vermehrung der membranständigen Rezeptoren (sog. „up-regulation“; „flare-up Effekt“). Bei längerfristiger Einwirkung kommt es entsprechend der Wirkung einer GnRH-Dauerinfusion zur Abnahme der Rezeptorendichte. Die Agonisten-Rezeptorenkomplexe werden in die gonadotrope Zelle aufgenommen („Internalisierung“) und lysosomal abgebaut. Die Neusynthese der Rezeptoren ist nicht in der Lage, den Rezeptorverlust rasch genug zu ersetzen. Die Rezeptorendichte an der Zellmembran der gonadotropen Zelle nimmt ab („Down-regulation“). Gleichzeitig werden die Postre-

zeptormechanismen gehemmt und die Synthese von FSH und LH nimmt ab. Die Hypophyse wird desensibilisiert und refraktär gegenüber dem Stimulus des hypothalamischen GnRH. FSH- und LH-Konzentrationen im Serum fallen ab, die Follikelreifung arretiert, die ovarielle Sexualsteroidbiosynthese kommt zum Erliegen und es werden Sexualsteroidkonzentrationen im Serum auf Kastrationsniveau erreicht. Das Ergebnis ist ein medikamentös induzierter hypogonadotroper Hypogonadismus auf Zeit. Nach Beendigung der Agonistenbehandlung setzt nach durchschnittlich 6 Wochen wieder ein hypothalamisch-hypophysär gesteuerter Zyklus ein. Diese pharmakologischen Phänomene stellen die Basis des therapeutischen Einsatzes der GnRH-Agonisten dar. Überall dort, wo eine medikamentös induzierte, aber voll reversible Kastration erwünscht ist, finden sich die Indikationen für den Einsatz der GnRH-Agonisten.

Durch weitere Modifikation der Struktur des natürlichen Dekapeptides war es möglich, auch antagonistisch wirkende Analoga zu synthetisieren. Diese unterscheiden sich ganz wesentlich in ihrer pharmakologischen Wirkungsweise. Während GnRH-Agonisten eine kontinuierliche, nicht pulsatile Stimulation der gonadotropen Zellen imitieren und auf diesem Wege zu einer „Down Regulation“ der GnRH-Rezeptoren und infolgedessen zu einer „Desensibilisierung“ der Adenohypophyse führen, wirken GnRH-Antagonisten auf der Grundlage einer klassisch kompetitiven Rezeptorblockade ohne jegliche intrinsische Aktivität. Auf diese Weise wird ein initialer stimulierender Effekt vermieden. Die supprimierende Wirkung der Gonadotropinsekretion tritt sofort ein. Während GnRH-Agonisten bereits seit Jahren fest etablierte Medikationen darstellen, wenn eine medikamentöse, temporäre und voll reversible Kastration indiziert erscheint, sind GnRH-Antagonisten erst kürzlich für die klinische Praxis, und bisher nur für die kontrollierte ovarielle Hyperstimulation (COH) im Rahmen der Assistierten Reproduktion (ART) zugelassen worden. Das Indikationsspektrum für die beiden Formen der GnRH-Analoga ist prinzipiell gleich (Kontrollierte ovarielle Stimulation, Behandlung sexualsteroidabhängiger Malignome, Pubertas praecox, Behandlung sexualsteroidabhängiger benignen Erkrankungen) [1].

Präklinische/experimentelle Daten

Die Struktur der GnRH-Antagonisten ist deutlich komplexer und die Modifikationen der Aminosäuresequenz zahlreicher als die der GnRH-Agonisten. Während GnRH-Agonisten sich vor allem durch die Einführung unnatürlicher, rechtsdrehender Aminosäuren an Position 6 und 10 auszeichnen, weisen GnRH-Antagonisten solche Veränderungen nicht nur an den Positionen 6 und 10, sondern auch an den Positionen 1,2,3 und 8 auf. GnRH-Antagonisten binden mit hoher Affinität kompetitiv an den GnRH-Rezeptoren der gonadotropen Zellen. Innerhalb weniger Stunden wird die Gonadotropinsekretion supprimiert, wobei diese Suppression in Ausmaß und Dauer dosisabhängig ist [2].

Während die ersten experimentellen GnRH-Antagonisten als Nebenwirkung die Möglichkeit allergischer Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock aufwiesen, scheint dieses Problem im Falle der „modernen“ GnRH-Antagonisten wie dem Ganirelix (Organon, Oss, Netherlands) oder Cetrorelix (Serono Pharma, Geneva, Switzerland) gelöst zu sein [3]. Bei mehr als tausend in klinischen und präklinischen Studien zum Einsatz der COH behandelten Patientinnen ist bisher kein Fall einer Anaphylaxie beschrieben worden. Die Halbwertszeit von Cetrorelix nach einer Einzeldosis, subcutan injiziert, beträgt zwischen 5 und 10 Stunden, während nach mehrfacher Applikation eine Halbwertszeit von zwischen 20 und 80 Stunden beschrieben worden ist [4]. Die Halbwertszeit nach der einmaligen subcutanen Gabe einer Dosis von Ganirelix beträgt ca. 13 Stunden [5]. Beide Substanzen scheinen equipotent hinsichtlich des vollen Wirkungseintrittes der Gonadotropinsuppression innerhalb von 4 bis 8 Stunden [5,6].

Klinische Daten: Anwendung der GnRH-Antagonisten im Rahmen der kontrollierten ovariellen Hyperstimulation

Für die Vorbereitung zur In Vitro Fertilisation hat sich die Kombination von GnRH-Agonisten mit einer exogenen Gonadotropinmedikation zur sog. kontrollierten ovariellen Hyperstimulation (COH) fest etabliert. Ent-

sprechend den Angaben des Deutschen IVF-Registers sind in der Bundesrepublik Deutschland bei über 50000 Behandlungen im Jahr 1999 mehr als 75 %, dem sog. „langen“ agonistischen Protokoll entsprechend durchgeführt worden [7]. Hierbei wird die volle Suppression der HPO-Achse vor Beginn der Gonadotropinmedikation angestrebt. Klinische Grundlage dieses Vorgehens stellt die Beobachtung dar, dass ein spontaner vorzeitiger LH-Anstieg, wie er in ca. 20 % der Behandlungen beobachtet werden kann, wenn keine GnRH-Agonisten eingesetzt werden, sich sehr negativ auf die Qualität der gewonnenen Eizellen, der erzielten Embryonen und die Rate der zu beobachtenden Schwangerschaften auswirkt [8]. Allerdings verlangt die beschriebene Vorgehensweise eine Vorlaufzeit von ca. 14 Tagen, bis die erwünschte volle Suppression der gonadotropen Zellen erzielt ist.

Im Vergleich hierzu erscheint der Einsatz der sofort und ohne initial stimulierenden Effekt wirkenden GnRH-Antagonisten physiologischer.

Bereits 1991 berichteten Dittkoff et al. von der Möglichkeit, durch repetitive Gaben des experimentellen GnRH-Antagonisten Nal- Glu in der Zyklusmitte, die spontane Ovulation zu verhindern bzw. zu postergieren [9]. Frydman et al. (1991) konnten zeigen, dass dies auch im Rahmen der COH möglich ist [10].

COH unter Verwendung von GnRH-Antagonisten: 2 Protokolle

Mittlerweile sind zwei verschiedene Anwendungsmodalitäten in der COH zur Vorbereitung der ART beschrieben und in zahlreichen klinischen Phase II- und Phase III-Studien geprüft worden.

Das „single dose protocol“

Drei Milligramm des GnRH-Antagonisten Cetrorelix, appliziert am 8. Zyklustag sind in der Lage, einen vorzeitigen LH-Anstieg für bis zu 92 Stunden sicher zu verhindern. Nur wenn innerhalb dieser Zeitspanne die Kriterien zur Ovulationsinduktion nicht erfüllt erscheinen, muss im gegebenen Fall mit weiteren täglichen Injektionen in niedriger Dosierung (0,25 mg/die) wei-

LH-rise	Oocyte pickup (n)	Fertilisation rate (%)	Implantation rate (%)	Clinical ongoing pregnancy rate (%)
≥ 10 U/l	17	64.7 %	12 %	21 %
> 15 U/l	12	65.3 %	18 %	30 %
> 20 U/l	7	66.7 %	12 %	17 %
No rise	138	71.3 %	16 %	26 %

Tab. 1: Ergebnisse der Cetrorelix-„single-dose“-Behandlungen ohne und mit Anstieg der LH-Konzentrationen vor Verabreichung des GnRH-Antagonisten (3 mg am 7. Stimulationstag) [11]

terbehandelt werden. Es konnte dabei gezeigt werden, dass auch in dem Falle, dass die LH-Konzentrationen bereits im Steigen begriffen waren, die Verabreichung des GnRH-Antagonisten in der Lage war, diesen vorzeitigen LH-Anstieg zu couperieren. Dies hatte keine negativen Auswirkungen auf die erzielten Fertilisations- und Schwangerschaftsraten (Tab. I).

Das „multiple dose protocol“

Die ersten klinischen Erfahrungen mit dieser Behandlungsmodalität, die auch als sog. Lübecker Protokoll bezeichnet wird, wurden bereits 1994 publiziert [12].

Die Stimulation beginnt am 2. Tag des spontanen Zyklus mit 150 IE FSH. Vom 5. oder 6. Simulationstag an wird täglich der GnRH-Antagonist Cetrorelix oder Ganirelix in seiner minimal effektiven Dosierung (0,25 mg/die) parallel zur Gonadotropinmedikation verab-

reicht, bis die Kriterien zur Ovulationsinduktion erfüllt sind [13].

Prospektive, randomisierte und kontrollierte Studien, die den Einsatz sowohl des Cetrorelix, als auch des Ganirelix mit den Ergebnissen einer Kontrollgruppe von Patientinnen verglichen, die entsprechend dem agonistischen „langen“ Protokoll behandelt wurden, zeigten die Gleichwertigkeit der GnRH-Antagonisten hinsichtlich der sicheren Vermeidung von vorzeitigem LH-Anstiegen. Allerdings waren die erzielten Schwangerschaftsraten in der GnRH-Antagonistengruppe jeweils niedriger als in der Vergleichsgruppe, ohne dass diese Unterschiede statistisch signifikant waren. Hingegen war die Inzidenz des schweren ovariellen Überstimulationssyndroms (OHSS II-III) in allen bisher publizierten Studien signifikant niedriger in der Antagonistengruppe. Während z. B. in der mit Cetrorelix entspre-

	IVF	ICSI*	Overall
Patients (n)	149	173	322+
COC	1279	1692	2971
Mature oocytes (IVF) (n)	811		
(% of COC) ¹	63.0 ± 35.6		
Metaphase II oocytes (ICSI)(n)		1252	
(% of COC) ¹		74.7 ± 25.0	
Fertilisation rate (%)** ¹	60.4 ± 26.3	58.2 ± 24.6	59.2 ± 25.3
Embryos	605	647	1252
Excellent (n)	211	219	430
(% of all)	34.9	33.8	34.3
Good (n)	281	298	579
(% of all)	46.4	46.1	46.2
Fair (n)	113	130	243
(% of all)	18.7	20.1	19.4
Patients with embryo transfer	134	163	297
Clinical pregnancies			
(treatment cycle)	30	40	70
Pregnancy rate/ET (%)	22.4	24.5	23.6
Babies born after ET	33	45	78
Babies born/replaced			
embryos (%)	9.3	10.2	9.8
Miscarriages (n)	6	6	12
(%)	20.0	15	17.1

* in 11 patients IVF and ICSI was performed

** only patients included with total number of obtained oocytes > 0

¹ patient based ratios

Tab. II: Gewonnene Cumulus-Oocyte-Complexe, Fertilisationsraten, Schwangerschaftsraten und Abortraten [15]

chend dem Lübecker Protokoll behandelten Gruppe die Inzidenz nur 1,7 % betrug, lag die Inzidenz in der mit Buserelin entsprechend dem „langen“ agonistischen Protokoll behandelten Gruppe bei 6,5 %! [14,15,16]. Dies ist eine Beobachtung von erheblicher klinischer Bedeutung.

In einer prospektiven, offenen, nicht randomisierten Studie wurden 346 Patientinnen mit 0,25 mg Cetorelix entsprechend dem „Lübecker“ protocol behandelt. Im Durchschnitt wurden 2,66 Embryonen zurückgesetzt. Die erzielte „clinical ongoing pregnancy rate“ betrug 23,6 % pro Embryotransfer. Die Abortrate betrug 17 %. Die mittlere Anwendungsdauer des GnRH-Antagonisten pro Zyklus betrug 5 Tage, die mittlere Stimulationsdauer 10,4 Tage. Im Median wurden 23 Ampullen Humanes Menopausen Gonadotropin (hMG) pro Behandlungszyklus verbraucht. Die Inzidenz der vorzeitigen Luteinisierung betrug nur 0,89 % [15] (Tab. II).

Ergebnisse der Interims-Analyse einer multizentrischen, multinationalen Phase III-b Studie mit Cetorelix (0,25 mg/die; „multiple dose protocol“)

In dieser in 88 Zentren in 11 Ländern entsprechend dem „multiple dose protocol“ an 531 Patientinnen durchgeführten Studie konnte bisher eine klinische Schwangerschaftsrate von 27 % pro Embryotransfer erzielt werden. Ob dieses Ergebnis ausreichen wird, um die Diskussion über mögliche direkte, auf die Implantation sich auswirkende Effekte der GnRH-Antagonisten zu beenden, erscheint zunächst noch fraglich. Wiederum war die Inzidenz des schweren, hospitalisationspflichtigen OHSS mit 1,1% erfreulich niedrig [17].

Kritische Bewertung für die Praxis

Auch wenn es sicherlich noch verfrüht erscheint, bereits jetzt von einem Ende der GnRH-Agonisten zu sprechen, so erscheinen die theoretischen Vorteile der GnRH-Antagonisten, vor allem die Vermeidung der initialen stimulatorischen Wirkung und der sofortige Eintritt der therapeutischen Wirkung, evident. Die signifikant niedrigere Inzidenz des schweren OHSS im Vergleich zur Behandlung einer Patientin in der COH unter Verwendung eines GnRH-Agonisten scheint einen wesentlichen Beitrag zur Verbesserung der Behandlungssicherheit darzustellen. Hinsichtlich anderer Indikationen lassen die bisher auf dem Markt verfügbaren Konfektionierungen nur einen routinemäßigen Einsatz der GnRH-Antagonisten im Rahmen der COH zu. Dennoch ergeben sich auch jetzt schon neue Perspektiven, z. B. in der Behandlung des Uterus myomatosis oder der Endometriose [18].

Literatur

1. Reissmann T, Felberbaum R, Diedrich K et al. (1995): Development and applications of luteinizing hormone-releasing hormone antagonists in the treatment of infertility: an overview.
2. Felberbaum RE, Reissmann T, Küpker W et al. (1995): Preserved pituitary response under ovarian stimulation with hMG and GnRH-antagonists (Cetorelix) in women with tubal infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 61:151-155
3. Hahn DW, McGuire JL, Vale WW, Rivier J (1985): Reproductive/endocrine and anaphylactoid properties of an LHRH antagonist (ORF-18260). *Life Sci* 37:505-514
4. Duijkers IJM, Klipping C, Willemsen WNP, Krone D, Schneider E, Niebch G, Hermann R (1998): Single and multiple dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetorelix in healthy female volunteers. *Hum Reprod* 13:2392-2398
5. Mannaerts B, Oberye J, Peters M, Orlemans E (1999): Introduction to the GnRH-antagonist Ganirelix (Orgalutran). *Gyn Encrinol* 13(Suppl.1):12
6. Sommer L, Zanger K, Dyong T, Dorn C, Luckhaus J, Diedrich K, Klingmüller D (1994): Seven-day administration of the gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetorelix in normal cycling women. *Eur J Endocrinol* 131:180-285
7. Deutsches IVF – Register (2000): Jahrbuch 1999. Bundesgeschäftsstelle des Deutschen IVF-Registers, Ärztekammer Schleswig – Holstein, Bismarckallee 8-12, 23795 Bad Segeberg
8. Stanger JD and Yovich JL (1985) Reduced in vitro fertilization of human oocytes from patients with raised basal luteinizing hormone levels during the follicular phase. *Br J Obstet Gynaecol* 92:385-393
9. Ditkoff EC, Cassidenti DL, Paulson RJ, Sauer MV, Paul WL, Rivier J, Yen SS, and Lobo RA (1991) The gonadotropin-releasing hormone antagonist (Nal-Glu) acutely blocks the luteinizing hormone surge but allows for resumption of folliculogenesis in normal women. *Am J Obstet Gynecol* 165:1811-1817.
10. Frydman F, Conel C, De Ziegler D, Taieb J, Spitz IM, and Bouchard P (1991) Prevention of premature luteinizing hormone and progesterone rise with a gonadotropin-releasing hormone antagonist, Nal-Glu, in controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril* 56:923-927
11. Olivennes F, Fanchin R, Bouchard P, Taieb J, Selva J, and Frydman R (1995) Scheduled administration of a gonadotrophin-releasing hormone antagonist (Cetorelix) on day 8 of in-vitro fertilization cycles: a pilot study.
12. Diedrich K, Diedrich C, Santos E, Zoll C, Al-Hasani S, Reissmann T, Krebs D, Klingmüller D (1994) Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetorelix during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 9:788-791
13. Felberbaum R, Reissmann T, Küpker W, Al-Hasani S, Bauer O, Schill T, Zoll C, Diedrich C, Diedrich K (1996) Hormone profiles under ovarian stimulation with human menopausal gonadotropin (hMG) and concomitant administration of the gonadotropin releasing hormone (LHRH)- Antagonist Cetorelix at different dosages. *J Assist Reprod Genet* 13:216-222

14. Albano C, Felberbaum RE, Smitz J, Riethmüller-Winzen H, Engel J, Diedrich K, and Devroey P (2000) Controlled ovarian stimulation with HMG: results of a prospective randomized phase III European study comparing the LHRH-antagonist Cetrorelix (Cetrotide) and the LHRH-agonist Buserelin. *Hum Reprod* 15:526-531
15. Felberbaum RE, Albano C, Ludwig M, Riethmüller-Winzen H, Grigat M, Devroey P, Diedrich K (2000) Controlled ovarian stimulation for assisted reproduction with HMG and concomitant midcycle administration of the LHRH-antagonist Cetrorelix (Cetrotide®) according to the multiple dose protocol - results of a prospective non controlled phase III study. *Hum Reprod* 15:1015-1020
16. Olivennes F, Belaisch-Allart J, Emperaire JC, Dechaud H, Alvarez S, Moreau L, Nicollet B, Zorn JR, Bouchard P, Frydman R (2000) A prospective randomized controlled study in IVF-ET with a single dose of a LH-RH antagonist (Cetrorelix) or a depot formula of a LH-RH agonist (Triptorelin). *Fertil Steril* 73:314-320
17. Hamm W (1999): Multidose protocol: results of the largest multinational study with an antagonist in ART. *Middle East Fertility Society Journal* 4 (Suppl 3): 24-25
18. Felberbaum RE, Germer U, Ludwig M, et al. (1998): Treatment of uterine fibroids with a slow-release formulation of the gonadotrophin releasing hormone antagonist Cetrorelix. *Hum Reprod* 13:1660-1668

Effekte von Insulin-like growth factor I und II und Insulin auf gonadotrope Hypophysenzellen

J.M. Weiss, Y.-X. Xia, M. Chi, S. Polack, K. Diedrich und O. Ortmann

Zusammenfassung

Die Hypersekretion von Luteinisierendem Hormon (LH) ist eines der prominentesten Kennzeichen von Patientinnen mit Polyzystischem Ovar Syndrom (PCOS). In dieser Studie wurde geprüft, ob Insulin-like growth factor I und II (IGF-I und IGF-II) und Insulin, deren Bioaktivität bzw. Serumkonzentration bei Frauen mit PCOS erhöht ist, einen direkten Effekt auf die hypophysäre LH-Sekretion hervorrufen können. Des weiteren wurden die möglichen Mechanismen eines IGF-I Effektes untersucht. Zum einen, ob IGF-I die LH-Synthese steigert, zum anderen, ob wichtige frühe Schritte der GnRH-Signaltransduktion wie das Inositoltriphosphat moduliert werden.

Hypophysenzellen weiblicher Ratten wurden mit Insulin (1 nM), IGF-I (10 pM-10 nM) und IGF-II (0,05 pM-10 nM) oder Kombinationen dieser Hormone für 24 h in serumfreiem Medium vorbehandelt. Anschließend wurde eine Stimulation mit 1 nM GnRH für 3 h durchgeführt und der LH-Gehalt im Medium bestimmt.

In serumfreiem Medium bewirkten Insulin und IGF-I eine Steigerung der GnRH-induzierten LH-Sekretion. Eine deutliche Steigerung der GnRH-induzierten LH-Sekretion (+50 %) fand sich bei Ko-Inkubation der Zellen mit Insulin und IGF-I. IGF-II konnte nur in sehr geringen Konzentrationen und in nicht mit GnRH stimulierten Zellen eine geringe Steigerung der LH-Sekretion bewirken. Daher wurden mögliche Mechanismen der IGF-I Wirkung untersucht. IGF-I hatte keinen Einfluss auf die LH-Synthese. Die Inositoltriphosphatproduktion wurde durch IGF-I signifikant um knapp 40% gesteigert.

IGF-I und Insulin haben einen direkten Effekt auf die hypophysäre LH-Sekretion. Dieser könnte für die Hypersekretion von LH beim PCOS verantwortlich sein. Durch IGF-I werden frühe Schritte der GnRH-Signaltransduktion wie das Inositoltriphosphat, nicht jedoch die LH-Synthese, moduliert. IGF-II scheint bei der Regulation der LH-Sekretion eine unwesentliche Rolle zu spielen.

Einleitung

Das Gonadotropin-releasing Hormon (GnRH) ist ein hypothalamisches Dekapeptid, das hauptsächlich die

Sekretion der Gonadotropine Luteinisierendes Hormon (LH) und Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) aus der Hypophyse bewirkt (Conn et al. 1987; Catt und Stojilkovic 1989). GnRH bindet an hypophysäre Rezeptoren, die G-Protein gekoppelt sind. Der Weg, den das Signal dann bis zur Sekretion der Gonadotropine durchläuft, ist nicht vollständig aufgeklärt. Kurz zusammengefasst kommt es nach der Bindung des Liganden zur Phospholipase C vermittelten Hydrolyse von Phosphatidylinositol. Es entstehen Inositoltriphosphat und Diacylglycerol. Inositoltriphosphat bewirkt die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern des endoplasmatischen Retikulums. Kalzium ist ein Signalvermittler von zentraler Bedeutung. Am Ende der Signaltransduktionskette steht die Exozytose der Gonadotropine.

Die Freisetzung von LH wird durch gonadale Steroide moduliert (Ortmann 1992a,b, 1998). Insulin-like growth factor I und II (IGF-I und IGF-II) und Insulin könnten ebenso in die Regulation der LH-Ausschüttung eingreifen (Soldani 1994). Hauptcharakteristika des Syndroms der polyzystischen Ovarien beispielsweise sind tonisch erhöhte LH-Spiegel und Hyperinsulinämie mit ebenfalls erhöhter IGF-Aktivität. Das könnte ein klinisches Beispiel für die Hypothese sein, dass Insulin und IGFs die LH-Sekretion beeinflussen könnten.

IGF-I und II sind Polypeptide mit Molekulargewichten von über 7000 Da. Sie werden lokal von den meisten Geweben produziert und agieren sowohl endokrin als auch para- und autokrin (Wang und Chard 1999). Zellen des Hypophysenvorderlappens beinhalten reichlich IGF-II und exprimieren IGF Rezeptoren (Bach und Bondy 1992; O'Dell und Day 1998). IGF-I verstärkt die Sekretion von GnRH aus der Eminentia mediana und die Freisetzung von Gonadotropinen bei männlichen Ratten (Soldani 1995; Kanematsu 1991). Zur Wirkung von IGFs und Insulin auf weibliche Rattenhypophysenzellen existieren derzeit nur wenige Daten. Daher haben wir in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von IGF-I, IGF-II und Insulin und deren Kombinationen auf die LH-Sekretion und -Synthese weiblicher Rattenhypophysenzellen untersucht. Des Weiteren haben wir geprüft, ob die Wirkung von IGF-I auf die LH-Sekretion durch Inositoltriphosphat vermittelt wird.

Material und Methoden

Zellpräparation und Kulturbedingung

Die Hypophysen wurden weiblichen erwachsenen Sprague Dawley Ratten (Charles River, Kirchborchen) entnommen. Die Zyklusphasen der Ratten waren zufallsverteilt. Einzelzellsuspensionen wurden gewonnen, wie von uns bereits beschrieben (Ortmann et. al. 1990). Die Hypophysenvorderlappen wurden in kleine Stücke geschnitten. Nach Verdauung mit 0,5 % Trypsin wurden sie mit DNase und 0,1 % Trypsininhibitor behandelt. Die Zellen wurden nach vorsichtigem Pipetieren mittels Zentrifugation gewonnen. Sie wurden mit Trypanblau gefärbt, um ihre Funktionalität zu prüfen. Die Hypophysenzellen wurden auf Multiwell-Kulturplatten kultiviert. Für die Zellkultur wurde Medium 199 mit Hanks Salzen, L-Glutamin, 1,4 g/l Natriumbicarbonat, 10 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin und 10 % Pferdeserum, das mit 2 % Aktivkohle und 0,2 % Dextran T 70 vorbehandelt wurde, verwendet. Die Vorbehandlung befreit das Pferdeserum von endogenen Steroiden. Um das Anhaften der Zellen auf dem Boden der Kulturplatten zu ermöglichen, wurden sie für 36 Stunden in einen Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luft verbracht. Die Zellen wurden vor und nach den Experimenten gezählt, um auszuschließen, dass IGFs oder Insulin zu einer Zellproliferation führen. Die Vitalität der Zellen wurde durch die Trypanblauprobe geprüft und lag immer über 90%.

αT3-1 Kultur

Durch die oben beschriebene Präparation gelangt man zu einer gemischten Hypophysenzellpopulation. Diese Mischkultur enthält nur ca. 5-10 % gonadotrope Zellen. Um die Effekte von IGF-I speziell auf gonadotrope Hypophysenzellen aufzuzeigen, haben wir die gonadotrope Zelllinie αT3-1 gewählt. Sie wurde von Dr. PL Mellon (San Diego) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Behandlung der Zellen

Nach der Anwachsperiode wurden alle Zellen in serumfreiem Medium kultiviert. IGF-I, IGF-II und Insulin, alle in phosphate buffered saline (PBS) gelöst, wurden in den jeweiligen Konzentrationen für 24 h dem Kulturmedium zugesetzt. Unbehandeltes Kulturmedium mit PBS diente als Kontrolle. Vor der Stimulation der Zellen mit GnRH wurden sie mit serumfreiem Medium gewaschen und für 20 Minuten inkubiert. Das Medium wurde erneuert und GnRH wurde für 3 h direkt dem Medium zugesetzt. Danach wurde das Medium abgezogen und bei -20 °C tiefgefroren.

Für alle Experimente wurde serumfreies Medium gewählt, um den Einfluss anderer Wachstumsfaktoren auszuschließen (Huang et. al. 1998).

Messung des Gesamt LH-Gehaltes

Um zu klären, ob die LH de-novo Synthese für die Effekte von IGF-I auf die LH-Sekretion verantwortlich ist, wurde der intra- und extrazelluläre Anteil von LH untersucht. Damit konnte eine Aussage zum Gesamt-LH Gehalt der Zellen getroffen werden. Die Zellen wurden in serumfreiem Medium für 24 h mit 100 pM IGF-I behandelt und in den letzten drei Stunden der Kulturperiode mit 1 nM GnRH stimuliert. Wie oben beschrieben, wurde zunächst das Medium gesammelt, um den Anteil des extrazellulären LH zu bestimmen. Um den intrazellulären Anteil des LH zu gewinnen, wurden die Zellen lysiert. Dazu wurde den Zellen 20 mM Natriumkarbonat zugegeben. Die Kulturplatten wurden über Nacht bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen 5 Minuten lang mit Ultraschall behandelt. Das Medium wurde abgezogen und bei -20 °C gelagert bis zur LH-Messung.

Inositolphosphat-Bestimmung

Nach der Behandlung mit IGF-I in unterschiedlichen Konzentrationen wurde das Medium durch 5 µCi/ml myo-[H³] Inositol ersetzt und die Zellen damit 5-6 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden dreimal gewaschen und mit 100 nM GnRH für 15 Minuten in Anwesenheit von 10 mM LiCl stimuliert. Die Reaktion wurde durch Entfernen des Mediums und Zugabe von 1 ml Wasser von 95°C gestoppt. Die Kulturplatten wurden bei -80°C gelagert. Um [H³] Inositoltriphosphat von freiem Inositol zu trennen, wurde eine Anionenaustauschchromatographie angewendet. Nach Mischen mit einem Szintillationscocktail wurde in einem beta-Counter die Radioaktivität für 5 Minuten gemessen.

Effekte von IGF-I auf die LH-Sekretion

In einer ersten Serie von Experimenten untersuchten wir die Effekte von IGF-I auf die LH-Sekretion, um die wirkungsvollste IGF-I Konzentration für die weiteren Experimente zu bestimmen. Die Zellen wurden für 24 oder 48 h mit ansteigenden Konzentrationen von IGF-I behandelt (10 pM, 100 pM, 1 nM und 10 nM) und in den letzten drei Stunden mit 1 nM GnRH stimuliert.

Effekte von IGF-II auf die LH Sekretion

Um die möglichen Effekte von IGF-II auf die LH-Sekretion zu ermitteln, wurden die Zellen für 24 h mit ansteigenden Konzentrationen von IGF-II (0,05 pM-10 nM) behandelt und in den letzten drei Stunden mit 1 nM GnRH stimuliert.

Interaktion von Insulin und IGF-I

Um die Interaktionen von Insulin und IGF-I zu prüfen, haben wir die Zellen mit 1 nM Insulin und verschiedenen Konzentrationen von IGF-I (10 pM, 100 pM, 1 nM

und 10 nM) inkubiert und in den letzten drei Stunden mit 1 nM GnRH stimuliert,

Radioimmunoassay und Datenanalyse

Das LH wurde im Medium mittels eines Radioimmunoassays bestimmt. Es wurde der LH-Standard der Referenzpräparation des National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA) verwendet. Der intra- und inter-Assay Variationskoeffizient lag unter 5 %.

Die Daten von drei bis vier Experimenten, die aus Dreifachbestimmungen resultierten, wurden zusammengefasst und als Prozent der Kontrollen, die auf 100 % gesetzt wurden, ausgedrückt. Statistische signifikante Unterschiede wurden durch Ein-Faktor Varianz-Analyse (ANOVA) gefolgt von einem Dunnett Posttest bestimmt. P-Werte unter 5 % wurden als statistisch signifikant angesehen.

Ergebnisse

Effekte von IGF-I

IGF-I induzierte eine Steigerung der basalen LH Sekretion. Die maximale LH-Sekretion (+ 250%) wurde mit 10 nM IGF-I erreicht. Zellen, die mit IGF-I behandelt wurden, zeigten auch nach Stimulation mit GnRH eine gesteigerte LH-Antwort. Dieser Effekt war bei IGF-I Konzentrationen von 10 und 100 pM statistisch signifikant (Abb. 1a und b).

Effekte von IGF-II

IGF-II steigerte die basale LH Sekretion nur bei geringen Konzentrationen (0,05 pM) signifikant. Zellen, die mit GnRH stimuliert wurden, zeigten nach IGF-II Behandlung keine Steigerung der LH-Sekretion im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 2a und b).

Effekte von Insulin und IGF-I

Die Kombination von Insulin und IGF-I führte zu einer vermehrten GnRH-stimulierten LH-Sekretion als die Behandlung mit Insulin oder IGF-I allein. So führte beispielsweise die kombinierte Behandlung mit 100 pM IGF-I und 1 nM Insulin zu einer Steigerung der LH Sekretion um 30 %. Die maximale Steigerung der LH-Ausschüttung auf 150% wurde durch die Behandlung mit 1 nM IGF-I und 1 nM Insulin erreicht (Abb. 3).

Effekte von IGF-I auf den Gesamtgehalt an LH

Das Gesamt-LH, das sich aus intrazellulärem und extrazellulärem LH zusammensetzt, wird durch IGF-I nicht beeinflusst. Die de-novo Synthese von LH wird durch IGF-I nicht beeinflusst (Abb. 4).

Effekte von IGF-I auf das Inositoltriphosphat

In α T3-1 Zellen steigert 100 pM IGF-I die basale Inositoltriphosphatproduktion um 38 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Wenn die Zellen zusätzlich mit GnRH stimuliert werden, bleibt die Steigerung der Ino-

Abb. 1a

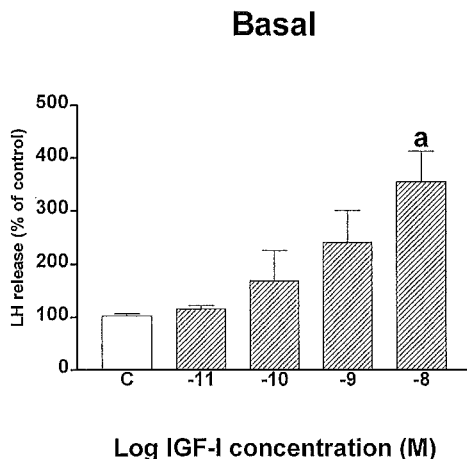


Abb. 1b

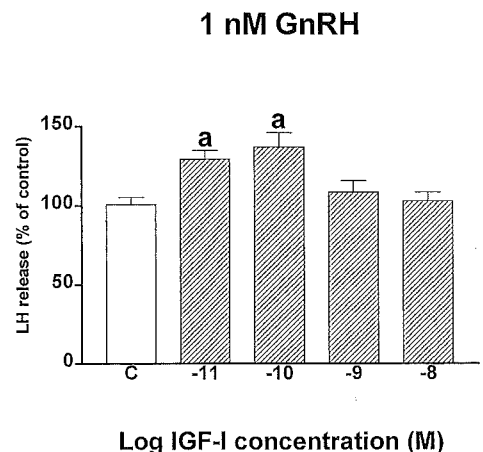


Abb.1 Effekte von ansteigenden Konzentrationen von IGF-I auf die basale (1a) und GnRH-induzierte (1b) LH-Sekretion in serumfreiem Medium. Hypophysenzellen wurden 24 h mit 10 pM - 10 nM IGF-I behandelt und für 3 h mit 1 nM GnRH stimuliert. Die Daten von vier unabhängigen Experimenten wurden gepoolt (Mittelwert $\pm$ SEM) und als Prozent der Kontrolle (C) ausgedrückt. a: $p < 0.05$ vs C.

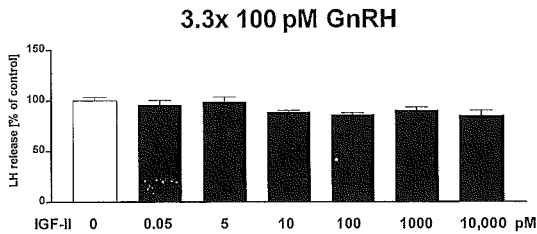
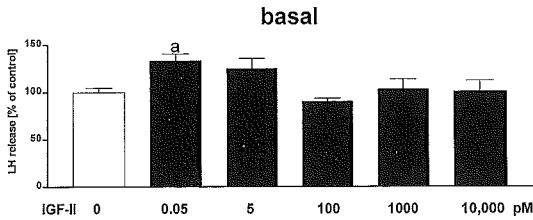


Abb. 2 Effekte von ansteigenden Konzentrationen von IGF-II auf die basale (2a) und GnRH-induzierte (2b) LH-Sekretion in serumfreiem Medium. Hypophysenzellen wurden 24 h mit 0.05 pM - 10 nM IGF-II behandelt und für 3 h mit 3.3x 100 pM GnRH stimuliert. Die Daten von vier unabhängigen Experimenten wurden gepoolt (Mittelwert±SEM) und als Prozent der Kontrolle (C) ausgedrückt. a: $p < 0.05$ vs C.

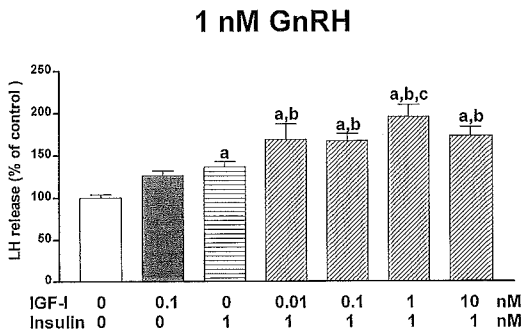


Abb. 3 Effekte der kombinierten Behandlung mit IGF-I und Insulin auf die GnRH-induzierte LH-Sekretion in serumfreiem Medium. Hypophysenzellen wurden 48 h mit 100 pM IGF-I, 1 nM Insulin oder Kombinationen von IGF-I (10 pM-10 nM) und 1 nM Insulin behandelt und für 3 h mit 1 nM GnRH stimuliert. Die Daten von vier unabhängigen Experimenten wurden gepoolt (Mittelwert±SEM) und als Prozent der Kontrolle (C) ausgedrückt. a: $p < 0.05$ vs C; b: $p < 0.05$ vs IGF-I; c: $p < 0.05$ vs Insulin.

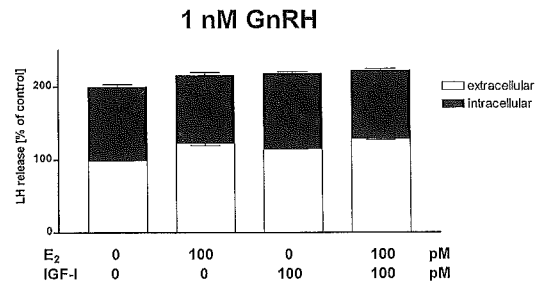


Abb. 4 Effekte der kombinierten Behandlung mit IGF-I und Östradiol (E) auf die GnRH-stimulierte LH-Freisetzung und den intrazellulären LH-Gehalt in serumfreiem Medium. Hypophysenzellen wurden 24 h mit 100 pM IGF-I, 100 pM Östradiol und Kombinationen von 100 pM IGF-I und 100 pM Östradiol behandelt und 3 h mit 1 nM GnRH stimuliert. Die Daten von drei unabhängigen Experimenten wurden gepoolt (Mittelwert±SEM) und als Prozent der Kontrolle (C) ausgedrückt. a: $p < 0.05$ vs C; b: $p < 0.05$ vs IGF-I; c: $p < 0.05$ vs E.

sitoltriphosphatproduktion mit 37 % nahezu identisch. Dieser Effekt ist statistisch signifikant ($p < 0,05$) (Abb. 5).

Diskussion

Eine Langzeitbehandlung mit niedrigen Konzentrationen von IGF-I führte zu einer signifikanten Steigerung der GnRH-induzierten LH-Sekretion weiblicher Rattenhypophysenzellen in serumfreiem Medium. Die Kombination von IGF-I und Insulin führt zu einer weiteren Steigerung der LH-Ausschüttung. IGF-II dagegen bewirkte eine geringe Steigerung der LH-Sekretion nur in nicht stimulierten Zellen in sehr niedrigen Konzentrationen. Da die Effekte von IGF-II sehr gering ausgeprägt waren, haben wir die Mechanismen der Steigerung der LH-Sekretion durch Behandlung mit IGF-I näher untersucht.

Wir haben die Hypothese untersucht, dass Wachstumsfaktoren die LH-Sekretion durch eine gesteigerte LH-Synthese erhöhen. Es zeigte sich, dass die LH-Synthese durch IGF-I nicht gesteigert wurde. Daher haben wir ein wesentliches Element der proximalen Signaltransduktion, das Inositoltriphosphat, untersucht. Es hat engen Bezug zur GnRH-induzierten Kalziummobilisation. Wir konnten zeigen, dass IGF-I die Inositoltriphosphatproduktion steigert.

Unsere Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zu den Resultaten von Soldani (1994). Diese Gruppe zeigte, dass eine Langzeitbehandlung mit IGF-II die basale und GnRH-induzierte LH-Sekretion, allerdings von

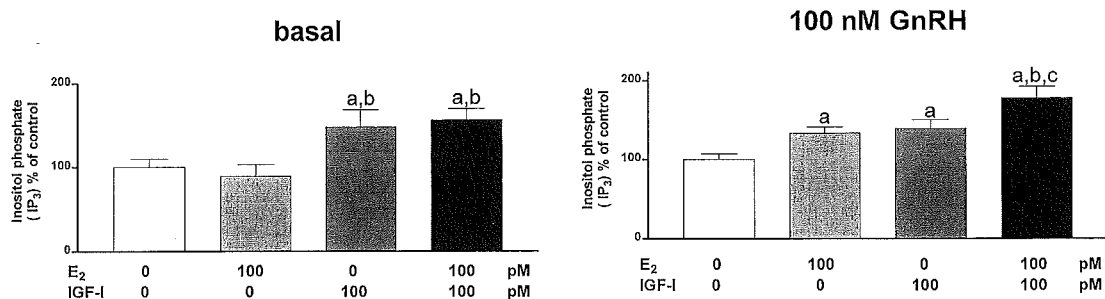


Abb. 5 Effekte von IGF-I, Östradiol (E) alleine und kombinierter Behandlung von IGF-I und Östradiol (E) auf die basale (5a) und GnRH-induzierte (5b) intrazelluläre IP₃ Akkumulation in serumfreien Medium. (T3-I Zellen wurden 24 h mit 100 pM IGF-I, 100 pM Östradiol oder Kombinationen von IGF-I (100 pM) und Östradiol (100 pM) behandelt und mit 100 nM GnRH für 15 min in Anwesenheit von 10 mM LiCl stimuliert. Die Daten von vier unabhängigen Experimenten wurden gepoolt (Mittelwert $\pm$ SEM) und als Prozent der Kontrolle (C) ausgedrückt. a: $p < 0.05$ vs C; b: $p < 0.05$ vs IGF-I; c: $p < 0.05$ vs E.

männlichen Rattenhypophysenzellen, dosisabhängig erhöht. Wir konnten nur für sehr geringe Konzentrationen und nur in nicht mit GnRH stimulierten Zellen eine geringe Steigerung der LH-Sekretion nachweisen. Diese Differenz mag am unterschiedlichen Geschlecht der Zellen und deren endokrinem Umfeld liegen.

Ähnlich wie der GnRH-Rezeptor erfährt der IGF-I-Rezeptor eine Internalisierung und down-Regulation bei hohen Konzentrationen des Liganden (Zapf 1994). Dies könnte teilweise erklären, warum gerade niedrige Konzentrationen von IGF-I zu einer Steigerung der LH-Sekretion führten. Für IGF-I sind unsere Resultate mit denen von Soldani (1994, 1995), Kanemastu (1991), Whitley (1995) und Weil (1999) weitgehend vereinbar.

Zwischen Insulin und IGF-I besteht eine enge Korrelation. IGF-I teilt 43 % der Aminosäuresequenz mit Insulin. Die biologischen Aktivitäten von Insulin und IGF-I sind einander ähnlich (Oomizu 1998). Des weiteren kann Insulin an IGF-I-Rezeptoren binden, allerdings mit niedriger Affinität. Ebenso kann IGF-I in hohen Konzentrationen an den Insulin-Rezeptor binden (Wang und Chard 1999). Sowohl IGF-I-Rezeptoren als auch Insulin-Rezeptoren finden sich in Rattenhypophysen (Bach und Bondy 1992). Unsere Resultate zeigten, dass an der Hypophyse additive Effekte von Insulin und IGF-I zu finden sind. Additive Effekt von Insulin und IGF-I sind in der Literatur bereits beschrieben. Mason (1994) berichtete, dass eine Insulin- und nachfolgend eine IGF-I-Behandlung die Östradiolfreisetzung aus Granulosazellen steigert. Oomizu (1998) zeigte, dass weder Insulin noch IGF-I allein, jedoch beide in Kombination die Proliferation von Hypophysenzellen steigern können. Um auszuschließen, dass proliferative Effekte für die LH-Sekretionssteigerung verantwortlich sind, haben wir in allen Experimenten die Zellen vor und nach Ab-

schluss der Experimente gezählt und keine signifikanten Unterschiede der Zellzahl gefunden.

Die Mechanismen der Effekte von IGF-I auf gonadotrope Zellen sind ungeklärt. Kanematsu (1991) berichtete, dass Anti IGF-I-Rezeptor Antikörper den Effekt von IGF-I auf die GnRH induzierte LH-Freisetzung minderten. Dies könnte darauf hindeuten, dass IGF-I wenigstens teilweise via IGF-I-Rezeptoren bei der Beeinflussung der LH-Sekretion agiert. Es ist weithin akzeptiert, dass die Mobilisation von Kalzium durch Inositoltriphosphat die Exozytose aktiviert (Stojilkovic 1990). Daher haben wir Inositoltriphosphat untersucht und gezeigt, dass IGF-I zu einer Steigerung der Inositoltriphosphatproduktion führt. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit der Hypothese, dass IGF-I auf gonadotrope Zellen über Membranrezeptoren wirkt und dass Inositoltriphosphate ein Teil ihres Postrezeptorsignals sein könnten.

Kurz zusammengefasst konnten wir in weiblichen Rattenhypophysenzellen zeigen, dass IGF-I die LH-Sekretion signifikant steigert, wohingegen IGF-II nur in geringen Konzentrationen die basale, nicht aber die GnRH-induzierte LH-Sekretion vermehrt. IGF-I und Insulin in Kombination führten zu einer stärkeren Stimulation der LH-Sekretion als beide Substanzen alleine. IGF-I zeigte keinen Effekt auf den LH-Gesamtgehalt der Zellen. Allerdings konnte IGF-I die Inositolphosphatproduktion signifikant vermehren.

Unsere Arbeit legt nahe, dass IGF-I zumindest teilweise via GnRH-Signaltransduktionswege agiert und die Inositoltriphosphatproduktion steigert. Die Fähigkeit von IGF-I, die LH-Sekretion zu erhöhen, scheint ein Resultat der Modifikation dieses frühen Schrittes der GnRH-Signaltransduktion zu sein, denn die LH-Synthese ist nicht beeinflusst. IGF-II spielt in der Regulation der LH-Sekretion keine wesentliche Rolle.

Literatur

1. Bach MA and Bondy CA (1992) Anatomy of the pituitary insulin-like growth factor system. *Endocrinology* 131: 2588-2594
2. Catt KJ and Stojilkovic SS (1989) Calcium signaling and gonadotropin secretion. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 1: 1-15
3. Conn PM (1986) The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone action. *Endocrine Reviews* 7: 3-10
4. Conn PM, Huckle WR, Andrews WV and McArdle CA (1987) The molecular mechanism of action of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the pituitary. *Recent Progress in Hormone Research* 43: 29-68
5. Huang YS, Rousseau K, Le Belle N, Vidal B, Burzawa Gerard E, Marchelidon J and Dufour S (1998) Insulin-like growth factor-I stimulates gonadotrophin production from eel pituitary cells: a possible metabolic signal for induction of puberty. *Journal of Endocrinology* 159: 43-52
6. Kanematsu T, Irahara M, Miyake T, Shitsukawa K and Aono T (1991) Effect of insulin-like growth factor I on gonadotropin release from the hypothalamus-pituitary axis in vitro. *Acta Endocrinologica* 125: 227-233
7. Mason HD, Willis DS, Holly JM and Franks S (1994) Insulin preincubation enhances insulin-like growth-II (IGF-II) action on steroidogenesis in human granulosa cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 78: 1265-1267
8. O'Dell SD and Day IN (1998) Insulin-like growth factor II (IGF-II). *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology* 30: 767-771
9. Oomizu S, Takeuchi S and Takahashi S (1998) Stimulatory effect of insulin-like growth factor I on proliferation of mouse pituitary cells in serum-free culture. *Journal of Endocrinology* 157: 53-62
10. Ortmann O, Sturm R, Knuppen R and Emons G (1990) Weak estrogenic activity of phenol red in the pituitary gonadotroph: re-evaluation of estrogen and antiestrogen effects. *Journal of Steroid Biochemistry* 35: 17-22
11. Ortmann O, Stojilkovic SS, Cesnjaj M, Emons G and Catt KJ (1992a) Modulation of cytoplasmic calcium signaling in rat pituitary gonadotrophs by estradiol and progesterone. *Endocrinology* 131: 1565-1567
12. Ortmann O, Tilse B and Emons G (1992b) Modulatory actions of estradiol and progesterone on phorbol ester-stimulated LH secretion from cultured rat pituitary cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 43: 619-627
13. Ortmann O, Tomic M, Weiss JM, Diedrich K and Stojilkovic SS (1998) Dual action of androgen on calcium signaling and luteinizing hormone secretion in pituitary gonadotrophs. *Cell Calcium* 24: 223-231
14. Soldani R, Cagnacci A and Yen SS (1994) Insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-II enhance basal and gonadotrophin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release from rat anterior pituitary cells in vitro. *European Journal of Endocrinology* 131: 641-645
15. Soldani R, Cagnacci A, Paoletti AM, Yen SS and Melis GB (1995) Modulation of anterior pituitary luteinizing hormone response to gonadotropin-releasing hormone by insulin-like growth factor I in vitro. *Fertility and Sterility* 64: 634-637
16. Stojilkovic SS, Stutzin A, Izumi S, Dufour S, Torsello A, Virmani MA, Rojas E and Catt KJ (1990) Generation and amplification of the cytosolic calcium signal during secretory responses to gonadotropin-releasing hormone. *New Biologist* 2: 272-283
17. Wang HS and Chard T (1999) IGFs and IGF-binding proteins in the regulation of human ovarian and endometrial function. *Journal of Endocrinology* 161: 1-13
18. Weil C, Carre F, Blaise O, Breton B and Le Bail PY (1999) Differential effect of insulin-like growth factor I on in vitro gonadotropin (I and II) and growth hormone secretions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of the reproductive cycle. *Endocrinology* 140: 2054-2062
19. Whitley NC, Barb CR, Utley RV, Popwell JM, Kraeling RR and Rampacek GB (1995) Influence of stage of the estrous cycle on insulin-like growth factor-I modulation of luteinizing hormone secretion in the gilt. *Biology of Reproduction* 53: 1359-1364
20. Zapf A, Hsu D and Olefsky JM (1994) Comparison of the intracellular itineraries of insulin-like growth factor-I and insulin and their receptors in rat-I fibroblasts. *Endocrinology* 134: 2445-2452

Melanocortine als hypothalamische Regulatoren der menschlichen Fettmasse

J. Born¹, R. Smolnik², H. L. Fehm²

Zusammenfassung

Der Fettanteil am Körpergewicht wird langfristig homöostatisch in Zentren des Hypothalamus geregelt. Die Regelung beruht dabei auf einer Balance der Aktivierung von Neuronennetzwerken, die unterschiedliche Neuropeptide produzieren und entsprechend entweder orexinogene oder anorexinogene Wirkungen vermitteln. Tierexperimentelle Befunde haben gezeigt, dass Melanocortine in dieser Regelung anorexinogene Wirkungen vermitteln. Die hier vorgestellten zwei Studien sollten prüfen, ob Melanocortine vergleichbare Wirkungen im Rahmen der hypothalamischen Regulation des Körperfettanteils beim Menschen entfalten. In Studie I wurden die Wirkungen jeweils 6 wöchiger Behandlungen (täglich 2 Gaben) mit den Melanocortinen, MSH/ACTH₄₋₁₀ und Desacetyl- α -MSH, mit denen einer Placebobehandlung bei normalgewichtigen Menschen verglichen. Die Peptide wurden intranasal verabreicht, um direkt zentralnervöse Wirkungen hervorzurufen. Die Ergebnisse zeigten, dass insbesondere MSH/ACTH₄₋₁₀ nicht nur das Körpergewicht und den mittels Bioimpedanzmessung erfassten Körperfettanteil signifikant reduzierte, sondern auch entsprechende Verminderungen der Plasmaleptin- und -insulinspiegel induzierte. D. h. auch die wichtigsten hormonalen Signale des Körperfettanteils zeigten nach intranasaler Behandlung mit MSH/ACTH₄₋₁₀ eine signifikante Reduktion des Fettanteils an. Studie II testete die Wirkungen einer auf 12 Wochen ausgedehnten Behandlung mit täglichen intranasalen Gaben von MSH/ACTH₄₋₁₀ (bzw. Placebo) bei fettleibigen Patienten. Im Gegensatz zu den Befunden bei Normalgewichtigen blieb die Behandlung bei den adipösen Patienten vollkommen wirkungslos. Aufgrund dieser bei der adipösen Behandlungsgruppe beobachteten Resistenz gegenüber den Melanocortinwirkungen muss angenommen werden, dass die der menschlichen Adipositas zugrundeliegende Fehlregulation in der Regel nicht – wie aufgrund tierexperimenteller Daten vielfach vermutet – die hypothalamische Melanocortinsynthese betrifft, sondern primär die Rezeption und weitere Verarbeitung dieses Signals.

Adipositas resultiert aus der Imbalance zwischen aufgenommener und abgegebener Energie. Innerhalb der industrialisierten Staaten haben in den letzten drei

Jahrzehnten Übergewicht und Fettleibigkeit und dadurch sekundär bedingte Erkrankungen dramatisch zugenommen (1-3). An dieser Entwicklung sind soziokulturelle Faktoren wie etwa ein bewegungsarmer Lebensstil und ein Übermaß an fettreicher Nahrung kausal beteiligt. Die Mechanismen der intraorganismischen Regulation des Körpergewichts sind offensichtlich nicht dafür ausgelegt, um diese im Verhalten begründeten Einflüsse hinlänglich adaptiv zu kompensieren.

Das Körpergewicht und die Körperfettmasse werden langfristig homöostatisch reguliert. Als übergeordneter Regler fungieren dabei neuronale Zentren innerhalb des Hypothalamus (4-8). Diese Zentren verarbeiten eine Vielzahl von neuronalen und hormonalen Inputsignalen aus der Peripherie, die Informationen sowohl über die akute Nahrungsaufnahme als auch über die in Form von Fettmasse gespeicherten Energiereserven rückmelden. Von eminenter Bedeutung sind dabei die Hormone Leptin und Insulin (4,6,7, 9-11). Die Plasmakonzentrationen dieser Hormone korrelieren positiv mit der Körperfettmasse und signalisieren so dem hypothalamischen „Lipostaten“ entsprechende Energiereserven. Der regulative Output der hypothalamischen Zentren besteht in einer balancierten Aktivierung orexinogener bzw. anaboler und anorexinogener, kataboler metabolischer Prozesse. So führt z. B. bei gegebenem Sollwert eine länger andauernde Reduktion der Nahrungsaufnahme in der Regel zu einer Hemmung kataboler Prozesse, die einer Gewichtsreduktion entgegenwirkt. Der Sollwert ist in diesem System durch die Aktivierbarkeit bzw. Aktivierung dieser efferenten Steuerungssysteme repräsentiert. So wäre eine Sollwertveränderung im Sinne einer Reduktion des Körpergewichts z. B. dann erreicht, wenn trotz verringerter Nahrungsaufnahme keine gegenregulatorische Hemmung kataboler Prozesse aufträte.

Während für die hypothalamische Stimulation anaboler Prozesse Neuropeptid Y (NPY) synthetisierende Netzwerke von herausragender Bedeutung sind, wird die Aktivierung kataboler metabolischer Prozesse insbesondere durch hypothalamische Zentren vermittelt, die sich im Nucleus arcuatus befinden und Melanocortine als peptiderge Überträgersubstanzen bilden (4,5,12). Die Melanocortine bilden eine Gruppe von

strukturverwandten Neuropeptiden, die sich aus dem Vorläufermolekül Proopiomelanocortin (POMC) ableiten, das auch Vorläufer für die peripher wirksamen Hormone Adrenocorticotropin (ACTH) und Melanocyten-stimulierendes Hormon (MSH) ist. Die Bedeutung der Melanocortine für die Gewichtsregulation wurde erstmals im Rahmen experimenteller Manipulation des sogenannten „Agouti-Proteins“ nachgewiesen (13-16). Das Agouti-Protein bindet den Melanocortin-Rezeptor (MC-R) und antagonisiert darüber kompetitiv die Wirkungen von α -MSH, das natürlicherweise diesen Rezeptor aktiviert. Die bei Mäusen durch entsprechende Genmutation induzierte ektopische Expression des Agouti-Proteins führte in diesen Experimenten unter anderem dazu, dass diese Tiere stark adipös wurden und einen Diabetes mellitus entwickelten.

Weiterführende Tierexperimente zielten darauf ab, den für die Körperfettregulation relevanten Subtyp des MC-R zu identifizieren. Von den bisher 5 bekannten MC-R-Subtypen scheint insbesondere der MC4-R Körperfettregulierende Funktionen zu vermitteln, insofern die genetische Ausschaltung dieses Rezeptors bei Mäusen ebenfalls mit Adipositas, Hyperphagie, Hyperinsulinämie und Hyperglycämie assoziiert war (15,17-18). Die in-vitro-Testung verschiedener Melanocortine zeigte, dass der MC4-R insbesondere durch Desacetyl- α -MSH aktivierbar ist, das allerdings auch MC1-, MC3- und MC5-R aktiviert (19-20). Der MC4-R wird ebenfalls – wenn auch signifikant schwächer – durch MSH/ACTH₄₋₁₀ stimuliert. Dieses Fragment repräsentiert die Kernsequenz aller Melanocortine und stimmt außerdem in 3 seiner Aminosäuren strukturell mit dem Agouti-Protein überein (20-22).

Die Mechanismen der hypothalamischen Regulation von Körpergewicht und Fettmasse sind bisher ausschließlich am Tiermodell untersucht worden. Die Adipositas, wie sie in Assoziation mit dem typischen Lebensstil in westlichen Industrienationen auftritt, stellt andererseits eine humanspezifische Erkrankung dar. Die Hypothese, dass das Melanocortinsystem im Rahmen der hypothalamischen Gewichtsregulation efferent Prozesse vermittelt, die zur Senkung von Fettmasse und Körpergewicht führen, bedarf daher zwingend einer Validierung im Humanexperiment. Wir stellen hier zwei Studien vor, in denen die zentralnervösen Wirkungen von täglich durchgeführten, subchronischen Melanocortinbehandlungen zunächst bei Normalgewichtigen (Experiment I, siehe auch Ref. (23)) und dann bei adipösen Patienten (Experiment II) auf Indikatoren von Körper- und Fettmasse untersucht wurden. Neben der Erfassung des Gewichts und des Körperfettanteils (letzteres mittels bioelektrischer Impedanzmessung) wurden auch die Plasmaleptin- und –insulinspiegel gemessen. In Experiment I wurden bei Normalgewichtigen zunächst die Wirkungen von MSH/ACTH₄₋₁₀ und Des-

acetyl- α -MSH verglichen, die beide die Kernsequenz der Melanocortine enthalten, aber in unterschiedlichem Ausmaße den für die Gewichtsregulation möglicherweise entscheidenden MC4-R aktivieren. Da dieses Experiment I eindeutig stärkere Wirkungen für MSH/ACTH₄₋₁₀ indizierte, beschränkte sich die Folge-studie II bei adipösen Patienten auf die Evaluation der Wirkungen dieses Peptids.

Um direkt zentralnervöse Wirkungen der Peptide zu untersuchen, wurde auf die intranasale Gabe der Substanzen rekuriert. Sowohl Messungen von Hirnfunktionen, wie Reiz-evozierte hirnelektrische Potentialantworten, als auch direkte Messungen im Liquor, haben gezeigt, dass Neuropeptide wie die hier interessierenden Melanocortine nach der intranasalen Gabe beim Menschen direkt Zugang zum Hirnkompartiment erlangen (24-28). So führte die intranasale Applikation von MSH/ACTH₄₋₁₀ bei gesunden Menschen innerhalb von 30 min nach Gabe zu hochsignifikanten Anstiegen der Liquorkonzentration dieses Peptids, während gleichzeitig im Blut keine Konzentrationsanstiege nachweisbar waren (24). Die nasale Gabe ermöglicht daher die Untersuchung direkter zentralnervöser bzw. hypothalamischer Effekte des Peptids, ohne dass nennenswerte periphere Nebenwirkungen zu erwarten sind.

Methoden

Versuchspersonen

An Studie I nahmen 36 gesunde, normalgewichtige Studenten im Alter zwischen 19 und 35 Jahren mit einem mittleren Body Mass Index von 21.98 kg/m² (SEM: $\pm$ 0.34 kg/m²) teil. Die Teilnehmer der Studie II waren 26 übergewichtige Patienten im Alter zwischen 23 und 46 Jahren mit einem mittleren Body Mass Index von 29.72 $\pm$ 0.43 kg/m². Sekundärerkrankungen wurden bei den adipösen Teilnehmern durch entsprechende Routinediagnostik ausgeschlossen. Während in Studie I die Experimentalgruppen je zur Hälfte aus Männern und Frauen bestand, wurden in Studie II nur Männer einbezogen (um eventuelle interaktive Effekte mit dem Menstruationszyklus auszuschließen). Alle Teilnehmer waren Nichtraucher und nahmen akut keine Medikamente ein. In einem Zeitraum von 12 Stunden vor den 3 eigentlichen Laborsitzungen durften sie keinen Alkohol oder koffeinhaltige Getränke zu sich nehmen und mussten nüchtern bleiben. Das experimentelle Protokoll der Studien wurde von der örtlichen Ethikkommission gebilligt und alle Teilnehmer wurden über Risiken und etwaige Nebenwirkungen der Substanzgaben aufgeklärt.

Versuchsdesign und –ablauf

Die Studien wurden als Gruppenvergleiche aufgebaut und doppel-blind durchgeführt. In Studie I wurden

jeweils 12 der Versuchspersonen einer von drei Experimentalgruppen zugeordnet. Alle drei Gruppen erhielten zunächst über 4 Wochen die Placebobehandlung. In den folgenden 6 Wochen erhielt eine Gruppe weiterhin Placebo, die zweite Gruppe erhielt MSH/ACTH₄₋₁₀ und die dritte Gruppe Desacetyl- α -MSH. In Studie II wurden jeweils 13 der adipösen Teilnehmer einer von zwei Experimentalgruppen zugeordnet, die zunächst beide über zwei Wochen mit Placebo behandelt wurden. In den folgenden 12 Wochen erhielt eine der Gruppen weiterhin Placebo, während die andere Gruppe mit MSH/ACTH₄₋₁₀ behandelt wurde. Die Substanzgaben erfolgten täglich zweimal, jeweils morgens nach dem Erwachen und abends vor dem Einschlafen. Für die beiden Melanocortine wurden equimolare Dosierungen von 0.50 mg MSH/ACTH₄₋₁₀ und 0.84 mg Desacetyl- α -MSH pro Gabe verabreicht.

Für die intranasale Gabe wurden die Substanzen in sterilem Wasser gelöst und als Spray appliziert, sodass ein Spraystoß pro Nasenloch 0.25 mg MSH/ACTH₄₋₁₀ bzw. 0.42 mg Desacetyl- α -MSH enthielt. Die Sprayfläschchen wurden während der experimentellen Phase kühl bei 2-7° C gelagert und jeweils nach 7 Tagen gegen Fläschchen mit neuer Substanz ausgetauscht. Ein Verfall der Substanz innerhalb dieses Zeitraums wurde durch entsprechende HPLC-Analysen ausgeschlossen. Die Versuchspersonen führten ein Tagebuch, in dem die regelmäßige Einnahme der Substanz dokumentiert wurde.

Für alle Versuchsteilnehmer begann das Experiment mit einer ersten Vorbereitungssitzung, die im Wesentlichen zur Adaptation des Probanden an das Laborsetting diente. Darauf folgten zwei weitere Sitzungen: die erste Sitzung fand am Ende der 4 Wochen, bzw. in Studie II nur 2 Wochen, dauernden Baseline-Phase statt (in der alle Probanden mit Placebo behandelt worden waren). Die zweite Sitzung fand nach 6 Wochen der aktiven Behandlungsphase statt. Da in Studie II die Behandlungsphase nicht nur 6 sondern insgesamt 12 Wochen dauerte, wurde hier eine dritte Experimentalsitzung am Ende dieser zwölften Behandlungswoche durchgeführt. Die Experimentalsitzungen fanden immer zwischen 1:30 h und 3:30 h statt.

Damit die Probanden über die Studiendauer hinweg ihre normalen Essgewohnheiten nach Möglichkeit beibehielten und nicht mehr als sonst auf ihr Gewicht achteten, wurden ihnen das Hauptziel der Studie als solches nicht mitgeteilt. Stattdessen erhielten sie die Information, dass es um eine Untersuchung von Peptidwirkungen auf Gedächtnisleistungen ginge, die dann auch in den Experimentalsitzungen erfasst wurden. Zusätzlich wurden in diesen Sitzungen die Probanden gewogen und mittels Standard-Bioimpedanzmessung (BIA 2000-M, Data Input GmbH, Frankfurt) die Fett- und Wasseranteile der Körperzusammensetzung be-

stimmt (29). Aus den Bioimpedanzmessungen wurden zusätzlich Maße für den fettfreien Anteil der Körpermasse (lean body mass), die Körperzellmasse (body cell mass) und das Gesamtkörperwasser (total body water) abgeleitet. Am Ende der Sitzung wurde Blut für die Bestimmung der Konzentration der folgenden Hormone abgenommen: Leptin, Insulin, Adrenocorticotropin (ACTH), Cortisol, Thyreotropin (TSH), Triiodthyronin (fT3) und Thyroxin (fT4). Außerdem wurden der Blutdruck und die Herzrate gemessen. Für den Abschluss von Nebenwirkungen wurden zahlreiche klinische Routinelaborparameter (u. a. Serumkonzentrationen von K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Cl⁻, Kreatinin, Protein, CRP und γ -GT) und die Probanden wöchentlich nach etwaigen subjektiven Nebenwirkungen befragt. Bei diesen Gelegenheiten wurden sie auch gewogen.

Bestimmungen und statistische Analysen

Nach der Abnahme wurden die Blutproben sofort zentrifugiert und der Überstand bei -20°C eingefroren. Für die Bestimmungen von Leptin, Insulin und ACTH wurden kommerzielle Radioimmunoassays verwendet (Human Leptin RIA Kit, Cat. # HL-81K, Linco Research Inc., St. Charles, MO, Pharmacia Insulin RIA 100, Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Schweden, Lumitest ACTH, Brahms Diagnostica GmbH Berlin, Deutschland). Für die Bestimmung von Cortisol, TSH, fT3 und fT4 wurden enzymimmunometrische bzw. immunoluminometrische Assays verwendet (Enzymun-Test Cortisol ES 3000 und Elescsys, Boehringer Mannheim, Deutschland).

Die statistische Analyse der Wirkungen der Melanocortine beruhte auf Kovarianzanalysen (ANCOVA), die in der Regel einen Gruppenfaktor enthielten, der die Behandlungsgruppen repräsentierte. Als Kovariate gingen die jeweiligen Messwerte der ersten Sitzung (am Ende der Baselinephase) in diese Analysen ein. In Studie I wurde zusätzlich eine Kovariate eingeführt, mit der Menstruationszyklus bedingte Schwankungen des Progesteronniveaus und entsprechende Einflüsse auf den Gewebswasseranteil abgeschätzt bzw. kontrolliert werden sollten.

Ergebnisse

Eine Übersicht über die Wirkungen der Melanocortinbehandlungen auf Körperfett und Körpergewicht in den beiden Studien gibt Abbildung 1. In Studie I mit normalgewichtigen Probanden führte die 6-wöchige Gabe von MSH/ACTH₄₋₁₀ im Vergleich zur Placebobehandlung zu einer deutlichen Reduktion des Körperfettanteils um durchschnittlich 1.68 kg ($F(1,21) = 4.6$, $p < 0.05$). Parallel reduzierte sich das Körpergewicht um 0.79 kg ($F(1,21) = 14.6$, $p < 0.001$) und entsprechend auch der Body Mass Index ($F(1,21) = 14.9$, $p < 0.001$). Interessant ist, dass die Körperfettreduktion unter Behandlung

mit MSH/ACTH₄₋₁₀ gleichzeitig zu einer Senkung des Plasmaleptinspiegels um durchschnittlich 24 % (F(1,21)=6.4, p<0.02) und zu einer Senkung basaler Insulinspiegel um durchschnittlich 20 % führte (F(1,21)=4.4, p<0.05, siehe Abbildung 2, die eine Übersicht über die wichtigsten Hormoneffekte bringt). ACTH-Plasmaspiegel nahmen ebenfalls, allerdings nur leicht unter der MSH/ACTH₄₋₁₀-Behandlung ab (p<0.1). Dagegen zeigten sich die Schilddrüsenhormonspiegel genauso wie alle Routinelaborparameter und Herz-Kreislauf-Parameter durch die Behandlung unbeeinflusst (Tabelle 1).

Desacetyl- α -MSH führte ebenfalls zu einer allerdings sehr viel schwächeren und nicht die 5 %-Grenze der statistischen Signifikanz erreichenden Reduktion der Körperfettmasse (F(1,21)=3.6, p<0.1; Abbildung 1).

Senkungen des Körpergewichts sowie die Einflüsse auf Leptin- und Insulinkonzentrationen blieben nach der 6-wöchigen Behandlung mit Desacetyl- α -MSH ebenfalls insignifikant (Abbildung 2). Auch dieses Peptid hatte keine nennenswerten Einflüsse auf die klinischen Routinelaborparameter sowie auf die Herzrate und den Blutdruck (Tabelle 1). Während aber Behandlungseffekte unter MSH/ACTH₄₋₁₀ subjektiv nicht wahrgenommen wurden, meinte ein signifikanter Prozentsatz der mit Desacetyl- α -MSH behandelten Probanden am Ende der Studie, dass sie eine „aktive Wirksubstanz“ erhalten hätten ($\chi^2=6.21$, p<0.05).

Im Gegensatz zu Studie I an normalgewichtigen Probanden, führte in Studie II bei adipösen Versuchspersonen die Gabe von MSH/ACTH₄₋₁₀ zu keiner nachweisbaren Reduktion von Körperfett und Körpergewicht.

	Normal			Adipös	
	Placebo	MSH/ACTH ₄₋₁₀	desacetyl- α -MSH	Placebo	MSH/ACTH ₄₋₁₀
Körpergewicht (kg)	67.37 $\pm$ 0.21	66.58 $\pm$ 0.21 **	67.24 $\pm$ 0.21	96.23 $\pm$ 0.64	96.48 $\pm$ 0.56
Body Mass Index (kg/m ²)	21.94 $\pm$ 0.07	21.68 $\pm$ 0.07 **	21.89 $\pm$ 0.07	29.51 $\pm$ 0.19	29.57 $\pm$ 0.17
Körperfett (kg)	15.55 $\pm$ 0.50	13.87 $\pm$ 0.51 *	14.12 $\pm$ 0.50	25.08 $\pm$ 0.68	24.69 $\pm$ 0.59
Fettfreie Masse (kg)	51.73 $\pm$ 0.60	52.97 $\pm$ 0.60	52.95 $\pm$ 0.60	70.97 $\pm$ 0.98	71.92 $\pm$ 0.86
Gesamtkörperwasser (kg)	37.86 $\pm$ 0.44	38.76 $\pm$ 0.44	38.79 $\pm$ 0.44	51.94 $\pm$ 0.73	52.66 $\pm$ 0.64
Körperzellenmasse (kg)	26.82 $\pm$ 0.88	28.97 $\pm$ 0.88	29.29 $\pm$ 0.88	40.16 $\pm$ 0.70	41.18 $\pm$ 0.61
Leptin (ng/ml)	6.51 $\pm$ 0.46	4.97 $\pm$ 0.46 *	6.27 $\pm$ 0.46	8.00 $\pm$ 0.57	8.07 $\pm$ 0.50
Insulin (μ U/ml)	7.81 $\pm$ 1.09	6.29 $\pm$ 1.09 *	8.72 $\pm$ 1.09	12.49 $\pm$ 2.16	12.09 $\pm$ 1.89
ACTH (pg/ml)	15.93 $\pm$ 1.10	12.72 $\pm$ 1.09	12.93 $\pm$ 1.10	20.20 $\pm$ 1.35	20.19 $\pm$ 1.12
Cortisol (μ g/ml)	5.88 $\pm$ 0.60	5.27 $\pm$ 0.59	5.52 $\pm$ 0.59	8.07 $\pm$ 0.64	5.76 $\pm$ 0.58
TSH (μ U/ml)	1.07 $\pm$ 0.10	1.09 $\pm$ 0.10	1.23 $\pm$ 0.10	1.20 $\pm$ 0.11	1.16 $\pm$ 0.11
fT3 (pmol/l)	4.83 $\pm$ 0.12	4.95 $\pm$ 0.12	4.83 $\pm$ 0.12	4.79 $\pm$ 0.14	4.89 $\pm$ 0.14
fT4 (pmol/l)	15.75 $\pm$ 0.26	15.57 $\pm$ 0.26	15.61 $\pm$ 0.26	15.66 $\pm$ 0.23	15.81 $\pm$ 0.23
Systolischer BD (mmHg)	119.17 $\pm$ 2.86	120.23 $\pm$ 2.86	116.48 $\pm$ 2.93	124.67 $\pm$ 1.77	124.87 $\pm$ 1.55
Diastolischer BD (mmHg)	71.98 $\pm$ 1.94	71.33 $\pm$ 1.94	72.24 $\pm$ 1.93	82.50 $\pm$ 2.82	86.23 $\pm$ 2.46
Herzrate (Schläge/min)	66.99 $\pm$ 2.52	65.69 $\pm$ 2.59	67.16 $\pm$ 2.49	74.11 $\pm$ 2.73	70.38 $\pm$ 2.39
Natrium (mmol/l)	142.98 $\pm$ 0.50	142.65 $\pm$ 0.49	143.37 $\pm$ 0.50	141.22 $\pm$ 0.41	141.58 $\pm$ 0.38
Kalium (mmol/l)	4.30 $\pm$ 0.12	4.39 $\pm$ 0.11	4.38 $\pm$ 0.11	4.24 $\pm$ 0.08	4.18 $\pm$ 0.07
Kalzium (mmol/l)	2.43 $\pm$ 0.02	2.41 $\pm$ 0.02	2.47 $\pm$ 0.02	2.45 $\pm$ 0.02	2.40 $\pm$ 0.02
Chlorid (mmol/l)	100.04 $\pm$ 0.50	100.79 $\pm$ 0.49	99.92 $\pm$ 0.49	103.98 $\pm$ 0.62	104.55 $\pm$ 0.56
Kreatinin (μ mol/l)	86.46 $\pm$ 1.98	85.76 $\pm$ 2.01	86.79 $\pm$ 1.91	80.36 $\pm$ 2.65	79.31 $\pm$ 2.43
Protein (g/l) ¹	78.63 $\pm$ 1.17	77.84 $\pm$ 1.17	80.00 $\pm$ 1.16		
CRP (mg/l)	4.59 $\pm$ 1.04	2.74 $\pm$ 1.04	2.67 $\pm$ 1.04	4.05 $\pm$ 1.43	3.42 $\pm$ 1.31
γ -GT (U/l)	12.29 $\pm$ 1.95	9.91 $\pm$ 1.96	15.79 $\pm$ 1.95	24.84 $\pm$ 2.34	20.75 $\pm$ 2.15

** p $\leq$ 0.001, * p < 0.05, für paarweise Vergleiche mit Placebo. Die Werte sind entsprechend der berechneten Kovarianzanalysen auf eine gemeinsame Baseline angepasst. ACTH – adrenocorticotropin, TSH – Thyreotropin, fT3 – freies Triiodthyronin, fT4 – Thyroxin, CRP – C-reaktives Protein, γ -GT – γ -Glutamyltransferase. ¹Protein wurde in Experiment II bei Adipösen nicht bestimmt.

Tabelle 1

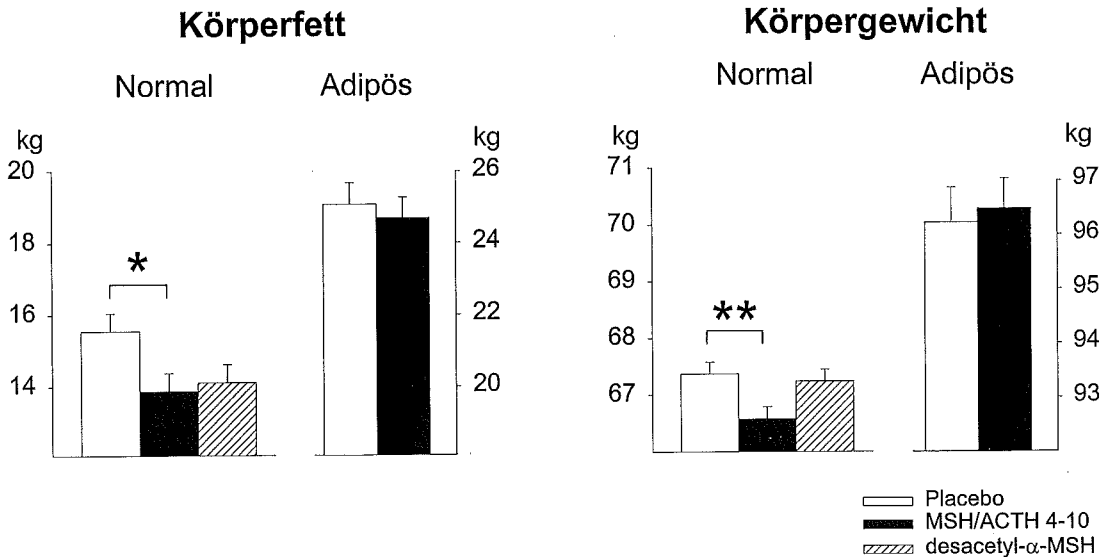


Abbildung 1: Mittelwerte ($\pm$ SEM) der Körperfettmasse (links) und des Körpergewichts (rechts) bei normalgewichtigen Probanden (Normal) und bei adipösen Patienten (Adipös) nach Abschluss intranasaler Behandlungen mit Placebo bzw. MSH/ACTH₄₋₁₀. Die Normalgewichtigen wurden über 6 Wochen behandelt; die Behandlungsdauer bei den Adipösen wurde auf 12 Wochen ausgedehnt. Eine zusätzliche Gruppe Normalgewichtiger wurde über 6 Wochen mit Desacetyl- α -MSH behandelt. Die Werte sind entsprechend der berechneten Kovarianzanalysen auf eine gemeinsame Baseline adaptiert.

* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, für paarweise Vergleiche mit der Placebobedingung.

Weder nach 6 Wochen noch nach der auf 12 Wochen verlängerten Behandlungsphase zeigten sich im Vergleich mit der Placebobedingung signifikante Senkungen in diesen Maßen ($p > 0.2$ für die entsprechenden statistischen Vergleiche, Abbildung 1). Leptin- und Insulinplasmaspiegel bewegten sich bei den adipösen Studienteilnehmern erwartungsgemäß insgesamt auf einem höheren Niveau als bei den gesunden Probanden der Studie I ($p < 0.05$, für den Vergleich beider Studiengruppen während der Baseline-Sitzung). Aber genauso wie das Körpergewicht und -fett blieben auch diese hormonellen Indikatoren metabolischer Regulation bei den Adipösen durch die Melanocortinbehandlung weitgehend unbeeinflusst (Abbildung 2). Der Plasma-leptinspiegel der Patientengruppe war nach der Behandlung mit MSH/ACTH₄₋₁₀ durchschnittlich sogar höher als vorher. Die Behandlung mit MSH/ACTH₄₋₁₀ induzierte aber bei den Adipösen Anzeichen einer Hemmung der Hypophysen-Nebennierenrinden-Aktivität, die sich in einer signifikanten Senkung der basalen Cortisolspiegel ausdrückte. Die Plasma-ACTH-Werte zeigten allerdings genauso wie die Plasmaspiegel der Schilddrüsenhormone keine systematischen Effekte des Melanocortins an. Nebenwirkungen traten auch bei der adipösen Behandlungsgruppe in Studie II nicht auf.

Diskussion

Die hier berichteten Studien sollten Aufschluss über die Rolle des zentralnervösen Melanocortinsystems bei der Regulation von Körpergewicht und Körperfettanteil beim Menschen geben. In-vitro- und Tierversuche zeigten, dass über die Aktivierung hypothalamischer Melanocortinrezeptoren, insbesondere des MC4-Rezeptorsubtyps, gewichtsreduzierende Effekte erzielt werden können, d. h. insgesamt Wirkungen, die funktional einer Senkung des Sollwerts in der homöostatischen Regelung der Körperfettmasse entsprechen (4,14,16-18). Die Fragen hier waren, ob sich diese Wirkungen auf den Menschen übertragen lassen und, wenn ja, ob über diese Wirkungen auch bei adipösen Patienten eine Sollwertreduktion der Körperfettmasse erreicht werden könnte.

Die Ergebnisse der Studie I bei normalgewichtigen Probanden zeigen, dass die tägliche intranasale Gabe des Melanocortins MSH/ACTH₄₋₁₀ über einen Zeitraum von nur 6 Wochen zu einer signifikanten Abnahme der Körperfettmasse führt. Dieser Befund bestätigt, dass das hypothalamische Melanocortinsystem auch beim Menschen eine zentrale Rolle in der überdauernden Regulation von Körpergewicht und -fettanteil spielt. Bemerkenswert ist, dass sich der reduzierende

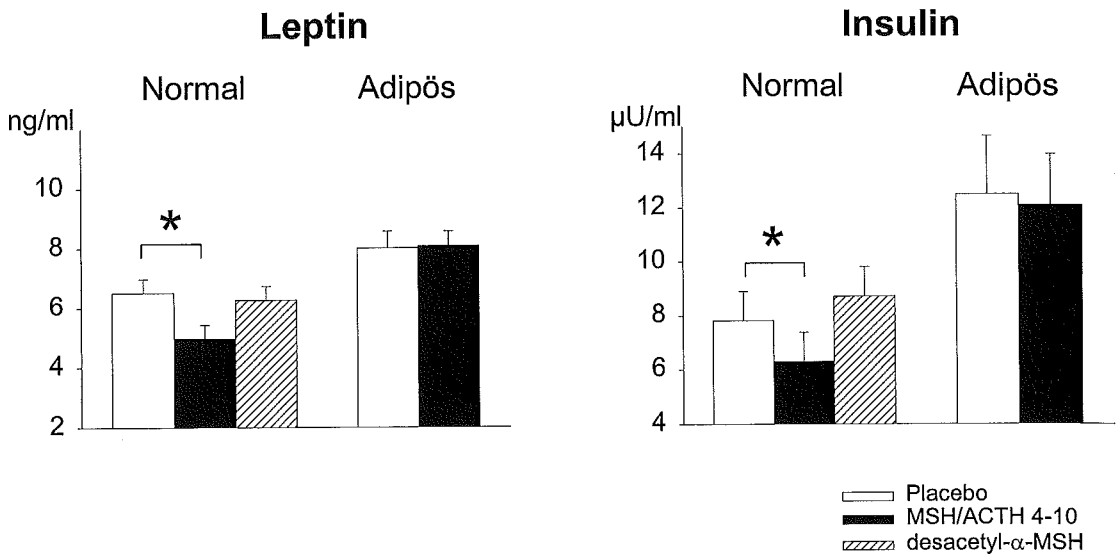


Abbildung 2: Mittelwerte ($\pm$ SEM) der Leptin- (links) und Insulinplasmakonzentrationen (rechts) bei normalgewichtigen Probanden (Normal) und bei adipösen Patienten (Adipös) nach Abschluss intranasaler Behandlungen mit Placebo bzw. $MSH/ACTH_{4-10}$. Die Normalgewichtigen wurden über 6 Wochen behandelt; die Behandlungsdauer bei den Adipösen wurde auf 12 Wochen ausgedehnt. Eine zusätzliche Gruppe Normalgewichtiger wurde über 6 Wochen mit Desacetyl- α -MSH behandelt. Die Werte sind entsprechend der berechneten Kovarianzanalysen auf eine gemeinsame Baseline adaptiert. * - $p < 0.05$, für paarweise Vergleiche mit Placebobedingung

Effekt der Behandlung mit $MSH/ACTH_{4-10}$ auf das Körpergewicht bei den normalgewichtigen Probanden konsistent nicht nur in den mittels Wägung bzw. bioelektrischer Impedanzmessung erfassten Massenparametern widerspiegelte, sondern auch in den hormonellen Gewichts- bzw. Fettmassenindikatoren, d. h. in signifikant erniedrigten Leptin- und Insulinspiegeln im Blut. Insofern die wöchentlich durchgeführten Wägungen der Probanden andeuteten, dass sich die Gewichtsreduktion nach $MSH/ACTH_{4-10}$ über die Behandlungsperiode hinweg ganz allmählich herausbildete, muss vermutet werden, dass sich die Wirkungen mit verlängerter Behandlungsdauer noch verstärkt hätten.

Der hier beobachtete Effekt von $MSH/ACTH_{4-10}$ beruht sehr wahrscheinlich auf einer direkten Wirkung des Peptids auf zentralnervöse Melanocortinrezeptoren. Sowohl human- als auch tierexperimentelle Befunde stützen die Annahme, dass die hier verwendete intranasale Gabe des Peptids eine direkte Beeinflussung der entsprechenden zentralnervösen Rezeptoren ermöglicht (24,26,30). Es wurde bei gesunden, normalgewichtigen Probanden gezeigt, dass die intranasale Gabe von $MSH/ACTH_{4-10}$ akut innerhalb von 30 min zu einer deutlichen Akkumulation des Peptids im Liquor führt (24). Bemerkenswert war, dass dabei parallel im Blut keine Erhöhung der $MSH/ACTH_{4-10}$ -Spiegel nachweisbar war. Dies könnte durch eine schnellere

Metabolisierung des Peptids im Blut bedingt sein, könnte aber auch auf eine sehr selektive Aufnahme der Substanz nach intranasaler Gabe in das Hirnkompartiment hindeuten. Auch wenn mit der intranasalen Gabe signifikante Mengen des Peptids in die Blutbahn gelangt sein sollten, ist es dennoch höchst unwahrscheinlich, dass die durch $MSH/ACTH_{4-10}$ eingeleitete Gewichtsreduktion durch einen peripheren Angriffspunkt vermittelt wird. Denn in der Körperperipherie befinden sich ausschließlich die MC1- und MC2-Subtypen des Melanocortinrezeptors, die $MSH/ACTH_{4-10}$ nicht binden. Entsprechend zeigte das Peptid erwartungsgemäß auch keine stimulierenden adrenocorticotropen Effekte.

Tierexperimentellen Befunden zufolge ist anzunehmen, dass $MSH/ACTH_{4-10}$ zentralnervös seine Wirkungen über eine Hemmung des NPY-Systems im Nucleus arcuatus des Hypothalamus entfaltet (4,5,12). Ob das Peptid letztlich vor allem zu verringerter Nahrungsaufnahme oder primär zu einer Steigerung der Energieabgabe führt oder über beide Faktoren gleichzeitig wirkt, lässt sich aufgrund der Daten nicht klären. Eine parallel, ebenfalls an normalgewichtigen, gesunden durchgeführte Studie ergab allerdings keine Hinweise, dass die subchronische intranasale Gabe von $MSH/ACTH_{4-10}$ mit deutlichen Veränderungen des Appetits assoziiert ist (31). Auf der anderen Seite wurden in der hier dar-

gestellten Studie unter Behandlung mit MSH/ACTH₄₋₁₀ keine Veränderungen kardiovaskulärer Funktionen oder der TSH-Konzentrationen im Blut festgestellt, die auf deutliche katabole Wirkungen des Peptids hingewiesen hätten. Allerdings reichen sicherlich schon sehr geringe Erhöhungen des basalen Metabolismus bzw. sehr leichte Veränderungen in der Regulation von Appetit und Sättigung aus, um über ein Intervall von 6 Wochen eine Gewichtsreduktion von ca. 1 kg zu etablieren. Derartig kleine Veränderungen können mit den hier eingesetzten Maßen kataboler Wirkungen bzw. mit den in anderen Studien (31) eingesetzten Verfahren zur Appetitmessung sicherlich nicht genau genug erfasst werden.

Überraschend war, dass in Studie I die Gabe von Desacetyl- α -MSH deutlich geringere Wirkungen auf das Körpergewicht und die Körperfettmasse hatte als MSH/ACTH₄₋₁₀. In der Tat erreichten die Wirkungen unter Behandlung mit Desacetyl- α -MSH keine statistische Signifikanz. Desacetyl- α -MSH ist das Melanocortin, welches natürlicherweise im Hypothalamus der Ratte und des Menschen mit der höchsten Konzentration nachweisbar ist und damit wahrscheinlich den wichtigsten endogenen Liganden des MC4-R repräsentiert (32). Tierexperimentelle Befunde lassen vermuten, dass vor allem über den MC4-Rezeptorsubtyp die gewichtssenkende Wirkung der Melanocortine vermittelt wird (5,6,17,18,33). Im Vergleich mit MSH/ACTH₄₋₁₀ besitzt Desacetyl- α -MSH in-vitro eine ca. 300 mal stärkere Potenz, die an den MC4-R gekoppelte Adenylcyclase zu aktivieren (19). Vor diesem Hintergrund ist die hier beobachtete geringere Wirksamkeit des Desacetyl- α -MSH schwer interpretierbar. Desacetyl- α -MSH ist in seiner Kernsequenz mit MSH/ACTH₄₋₁₀ identisch, enthält aber am C- bzw. N-Terminus jeweils 3 zusätzliche Aminosäuren. Es ist daher auch unwahrscheinlich, dass die verminderte Wirkung von Desacetyl- α -MSH durch eine schnellere Degradation des Peptids auf dem transnasalen Weg zum hypothalamischen Rezeptor verursacht wird. Allerdings liegen bisher keine Studien vor, in denen die Kinetik der hier interessierenden Melanocortine und ihr Abbau durch Hirnpeptidasen direkt verglichen wurden (34,35). Wahrscheinlicher ist daher, dass beim Menschen die Melanocortin-assoziierte Reduktion der Körperfettmasse nicht allein durch die Aktivierung des MC4-R vermittelt wird und die hier beobachteten Effekte von MSH/ACTH₄₋₁₀ zumindest teilweise auf einen anderen, bisher nicht identifizierten MC-Rezeptortyp zurückzuführen sind. Ein weiterer Beleg für diese Vermutung leitet sich aus den deutlichen Effekten ab, die MSH/ACTH₄₋₁₀ auf bestimmte Aspekte der Aufmerksamkeitsregulation und des Lernens ausübt. Diese sowohl im Human- als auch im Tierversuch konsistent nachgewiesenen Wirkungen sind nämlich in sehr ähnli-

cher Weise auch durch das synthetische MSH/ACTH₄₋₉-Analog ORG2766 hervorgerufen (36,37). Im Gegensatz zu MSH/ACTH₄₋₁₀ führt aber ORG2766 zu keiner nennenswerten Aktivierung des MC4-R (19). Möglich ist daher, dass beim Menschen neben dem MC4-R, andere Subtypen des MC-Rezeptors essentiell zur hypothalamischen Regulation der Körperfettmasse beitragen.

Die Daten der Studie I weisen erstmalig beim Menschen eine Beteiligung zentralnervöser Melanocortinsysteme an der homöostatischen Regulation des Körpergewichts nach. Naheliegender Versuch einer therapeutischen Nutzung dieser Wirkung im Rahmen der Adipositas. Studie II zeigt aber, dass bei übergewichtigen Patienten die Behandlung mit MSH/ACTH₄₋₁₀ weder nach 6 Wochen noch bei Ausdehnung auf 12 Wochen zu einer nennenswerten Reduktion des Körpergewichts und -fettanteils führt. Auch die Plasmaspiegel der wichtigsten Signalmoleküle des Körperfetts, Leptin und Insulin blieben bei den adipösen Teilnehmern durch die Behandlung mit MSH/ACTH₄₋₁₀ vollkommen unverändert. Offenbar geht Adipositas mit einer Resistenz gegenüber den gewichtsreduzierenden Wirkungen des Melanocortins einher. Insofern sind die negativen Ergebnisse der Studie II nicht nur enttäuschend. Sie weisen auch auf einen möglichen pathogenetischen Mechanismus bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Fettleibigkeit hin. Der Befund ermöglicht eine weitere Eingrenzung des defizitären Mechanismus, d.h. wo in der Kaskade der hypothalamischen Prozesse der Gewichtsregulation das ursächliche Defizit für die Adipositas zu lokalisieren ist.

Bei den adipösen Studienteilnehmern waren die basalen Plasmaleptin und -insulinspiegel erwartungsgemäß deutlich höher als bei den normalgewichtigen Probanden (10, 38). Physiologischerweise signalisiert insbesondere Leptin den Körperfettanteil zum hypothalamischen Lipostaten und löst darüber Prozesse aus, die der weiteren Speicherung von Fettreserven entgegenwirken. So führt die Gabe von rekombinantem Leptin bei genetisch adipösen (ob/ob) Mäusen, denen endogenes Leptin fehlt, zu einem sehr deutlichen Gewichtsverlust bei diesen Mäusen (39-40). Der anhaltend hohe Leptinspiegel, der bei adipösen Menschen beobachtet wird, spricht insofern für eine Resistenz bereits gegenüber dem Leptinsignal, d.h. bereits auf Ebene des Inputsignals der hypothalamischen Gewichtsregulation. In der Tat wurde experimentell die Präsenz einer Leptinresistenz auch bei Mäusen nachgewiesen, die nach entsprechend fettreicher Diät adipös wurden (41). Hypothalamische, Melanocortin produzierende Zellen solcher Mäuse zeigten eine aufgrund einer veränderten intrazellulären Signaltransduktion verminderte Responsivität gegenüber Leptin (38,41). Vermutet wurde daher, dass eine derartige Leptinresis-

tenz in Folge auch zu einer „down“-Regulation des Melanocortinsystems führen könnte (42). Allerdings deuten neuere humanexperimentelle Befunde darauf hin, dass zumindest die Melanocortinspiegel im Blut, erfasst durch die Konzentration von α -MSH, bei Adipösen eher erhöht als erniedrigt sind (43). Jene Beobachtung signifikant erhöhter, zirkulierender Melanocortinspiegel bei adipösen Menschen kann in Übereinstimmung mit den hier berichteten Ergebnissen als Hinweis auf eine Resistenz auch gegenüber den Effekten von Melanocortin bei Adipösen gedeutet werden, insofern selbst die kompensatorische Erhöhung des Melanocortinspiegels zu keiner Normalisierung des Körpergewichts führt. Die Hypothese einer Melanocortinresistenz bei Adipositas wird zusätzlich gestützt durch Tierexperimente, die eine bei adipösen im Vergleich zu normalgewichtigen Mäusen verminderte sympathische Aktivierung und eine abgeschwächte Blutdruckantwort auf die intracerebroventrikuläre Gabe von Melanocortinen zeigen (44).

Sicherlich gibt es Fälle, in denen die Ursache für die Adipositas in einer genetisch und/oder durch Veränderungen der intrazellulären Verarbeitung des Leptinsignals bedingten „down“-Regulation der Melanocortinproduktion und -freisetzung zu suchen ist (16,45). Die hier vorgestellten Befunde bei einer unselektionierten Gruppe übergewichtiger Menschen sprechen aber im Einklang mit früheren Beobachtungen erhöhter Melanocortinspiegel bei Adipösen (43) gegen die Annahme, dass der menschlichen Fettleibigkeit in der Regel ein Defizit der Melanocortinsynthese bzw. -freisetzung zugrunde liegt. Vielmehr ist das primäre Defizit bei dieser Erkrankung auf Ebene des Melanocortinrezeptors oder auf darauffolgenden Stufen in der hypothalamischen Verarbeitung des „Körperfettmasse“-Signals zu suchen. Zu prüfen ist nun, ob beim Menschen durch die intranasale Gabe von Peptiden diese späteren Stufen in der Körperfettregulation vielleicht ebenso erfolgreich manipulierbar sind, wie das hypothalamische Melanocortinsystem bei normalgewichtigen Probanden.

Literatur

1. Taubes G. 1998 As obesity rates rise, experts struggle to explain why. *Science* 280: 1367-1368.
2. Hill JO, Peters JC. 1998 Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science* 280: 1371-1374.
3. Walsh TB, Devlin MJ. 1998 Eating disorders: progress and problems. *Science* 280: 1387-1390.
4. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. 2000 Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671.
5. Spiegelman BM, Flier JS. 2001 Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104:531-543.
6. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M et al. 2001 Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480-484.
7. Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Schwartz MW. 1998 Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280: 1378-1383.
8. Flier JS, Maratos-Flier E. 1998 Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* 92: 437-440.
9. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Baskin DG. 1996 Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98: 1101-1106.
10. Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D. 1992 Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* 13: 387-414.
11. Schwartz MW et al. 1996 Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nature Med* 2: 589-593.
12. Woldbye DP et al. 1998 The how and Y of eating. *Nature Med* 4: 671-672.
13. Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP. 1992 Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 71: 1195-1204.
14. Lu D et al. 1994 Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371: 799-802.
15. Brash G. 1999 From the agouti protein to POMC – 100 years of fat blonde mice. *Nature Med* 5: 984-985.
16. Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U. 1999 Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nature Med* 5:1066-1070.
17. Huszar D et al. 1997 Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88: 131-141.
18. Benoit SC et al. 2000 A novel selective melanocortin-4 receptor agonist reduces food intake in rats and mice without producing aversive consequences. *J Neurosci* 20: 3442-3448.
19. Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD. 1994 Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8: 1298-1308.
20. Ollmann MM et al. 1997 Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278: 135-138.
21. Adan RAH, Cone RD, Burbach JPH, Gispén WH. 1994 Differential effects of melanocortin peptides on neural melanocortin receptors. *Mol Pharmacol* 46: 1182-1190.
22. Schiöth HB, Muceniec R, Larsson M, Wikberg JES. 1997 The melanocortin 1, 3, 4 or 5 receptors do not have a binding epitope for ACTH beyond the sequence of alpha-MSH. *Endocrinology* 155: 73-78.
23. Fehm HL, Smolnik R, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Born J. 2001 The melanocortin melanocyte-stimulating hormone/adrenocorticotropin(4-10) decreases body fat in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1144-8.
24. Born J, Lange T, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Fehm HL. Sniffing neuropeptides – A transnasal approach to the human brain. (eingereicht).
25. Balin BJ, Broadwell RD, Salzman M, El-Kalliny M. 1986 Avenues for entry of peripherally administered protein to the

- central nervous system in mouse, rat, and squirrel monkey. *J Comp Neurol* 251: 260-280.
26. Pietrowsky R, Thiemann A, Kern W, Fehm HL, Born J. 1996 A nose-brain pathway for psychotropic peptides: evidence from a brain evoked potential study with cholecystokinin. *Psychoneuroendocrinology* 21: 559-572.
 27. Kern W, Born J, Schreiber H, Fehm HL. 1999 Central nervous effects of intranasally administered insulin during euglycemia in humans. *Diabetes* 48: 557-563.
 28. Pietrowsky R, Strüben C, Mölle M, Fehm HL, Born J. 1996 Brain potential changes after intranasal versus intravenous administration of vasopressin: Functional evidence for a facilitated nose-brain passage for peptides. *Biol Psychiatry* 39: 332-340.
 29. Bioelectrical impedance analysis in body composition measurement: National Institutes of Health Technology Assessment Conference Statement. 1996 *Am J Clin Nutr (Suppl)* 64: 524S-532S.
 30. Baker H, Spencer RF. 1986 Transneuronal transport of peroxidase-conjugated wheat germ agglutinin (WGA-HRP) from the olfactory epithelium to the brain of the adult rat. *Exp Brain Res* 63: 461-473.
 31. Smolnik R, Mölle M, Fehm HL, Born J. 1999 Brain potentials and attention after acute and subchronic intranasal administration of ACTH 4-10 and desacetyl-a-MSH in humans. *Neuroendocrinology* 70: 63-72.
 32. Jacobowitz DM, O'Donohue TL. 1978 alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 6300-6304.
 33. Schwartz MW, Seeley RJ. 1997 Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Neuroendocrine responses to starvation and weight loss. *New Engl J Med* 336: 1802-1811.
 34. Bickel U, Born J, Fehm HL, Distler M, Voigt KH. 1988 The behaviorally active peptide ACTH 4-10: Measurement in plasma and pharmacokinetics in man. *Eur J Clin Pharmacol* 35: 371-377.
 35. Burbach JP, Lebouille JLM, Wang XC. 1986 In: DeWied D, Ferrari W, eds. *Central Actions of ACTH and Related Peptides*. Padua: Uliviana Press; 53-67.
 36. Greven HM, De Wied D. 1977 Influence of peptides structurally related to ACTH and MSH on active avoidance behaviour in rats. A structure-activity relationship study. *Front Horm Res* 4: 140-152.
 37. Born J, Fehm HL, Voigt KH. 1986 ACTH and attention in humans: a review. *Neuropsychobiology* 15: 165-186.
 38. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML et al. 1996 Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334:292-295.
 39. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M et al. 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543-546.
 40. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. 1995 Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269:546-549.
 41. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier JS. 2000 Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest* 105:1827-1832.
 42. Lin S, Storlien LH, Huang X. 2000 Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain Res* 875:89-95.
 43. Katsuki A, Sumida Y, Murashima S et al. 2000 Elevated plasma levels of alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH) are correlated with insulin resistance in obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:1260-1264.
 44. Lu H, Buisson A, Jen KC, Dunbar JC. 2000 Leptin resistance in obesity is characterized by decreased sensitivity to proopiomelanocortin products. *Peptides* 21:1479-1485.
 45. Krude H et al. 1998 Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature Genet* 19: 155-157.

Vasopressin verbessert nach subchronischer intranasaler Therapie die neuroendokrine Architektur des Schlafs alter Menschen

B. Perras, S. Assmus, K. Rödder, F. Albrecht, J. Born und H. L. Fehm

Zusammenfassung

Humanes Arginin-Vasopressin (AVP) zeigt neben den bekannten Wirkungen auf Wasserhaushalt und Kreislauf auch noch weitere, weniger gut untersuchte Einflüsse auf die neuroendokrine Regulation des Schlafs. Besonders auffallend sind dabei unterschiedliche Effekte in Abhängigkeit von der Applikationsdauer des Peptids. Nach kurzfristiger intravenöser Applikation wird eine Verschlechterung des Schlafs und eine Stimulierung der Kortisolsekretion beschrieben. Dagegen wurden nach subchronischer intranasaler Applikation eine Verbesserung des gestörten Schlafs alter Menschen mit Zunahme des Tiefschlafanteils und einer Verlängerung der Schlafzeit beobachtet. Die insuffiziente Hemmung der Ausschüttung von Kortisol ist mit dem Alter assoziiert und gilt als pathologischer Faktor, der zu zahlreichen altersbedingten Erkrankungen beiträgt. Deshalb untersuchten wir die Frage, ob AVP nach subchronischer Gabe neben der Verbesserung des Schlafs auch die Inhibition der Kortisolsekretion im frühen Nachtschlaf alter Menschen verstärkt.

26 gesunde alte Menschen (mittleres Alter 72.9 Jahre) wurden in einer doppelt blinden Untersuchung 10 Wochen mit 40 IE AVP oder Placebo intranasal behandelt. Parallel zur Schlafableitung wurde zu Beginn und am Ende der Behandlungsperiode engmaschig Blut zur Bestimmung von Hormonen und weiterer Laborwerte entnommen.

Unter intranasalem AVP nahm der Anteil des Tiefschlafs signifikant um 21.5 Minuten zu. Dieser Effekt war auch noch 24 Stunden nach Absetzen der Therapie nachweisbar. Die nächtliche Kortisolsekretion wurde nicht wie nach akuter Gabe von AVP stimuliert, sondern im Gegenteil signifikant unterdrückt. Die subchronische Therapie mit AVP war nebenwirkungsfrei, insbesondere wurde keine Änderung kardiovaskulärer Parameter oder des Salz-Wasserhaushalts beobachtet.

Die Ergebnisse belegen neben einer Vermehrung des Tiefschlafs bei alten Menschen auch einen begünstigenden Einfluss der subchronischen intranasalen AVP-Therapie auf die neuroendokrine Architektur des Schlafs.

Einleitung

Der Schlaf alter Menschen ist charakterisiert durch eine Fragmentierung durch häufiges Erwachen und eine Abnahme des Tiefschlafanteils (1,2). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde eine deutliche Verbesserung des altersbedingt gestörten Schlafs nach einer dreimonatigen Therapie mit intranasalem AVP beschrieben (3). Im Vergleich zu einer Placebo-Gruppe verbrachten die alten Menschen im Durchschnitt 4 % mehr Zeit im Tiefschlaf und die Gesamtschlafzeit verlängerte sich um 41 Minuten. Die Behandlung war sicher und Nebenwirkungen wie Bluthochdruck oder Störungen des Salz-Wasserhaushalts traten nicht auf.

Der Schlaf ist jedoch nicht nur ein zentralnervöses Geschehen, sondern geht parallel mit typischen endokrinen Veränderungen. Besonders auffällig ist das nächtliche Sekretionsverhalten von Kortisol und Wachstumshormon (GH, von engl. growth hormone). Während GH unmittelbar nach dem Einschlafen ein Sekretionsmaximum zeigt, wird die Ausschüttung von Kortisol gehemmt, so dass während der ersten, von Tiefschlaf dominierten Nachthälfte minimale Kortisol-Spiegel im 24 Stunden-Verlauf gemessen werden (4). In der zweiten Nachthälfte tritt Tiefschlaf seltener auf und die Kortisolspiegel nehmen graduell zu, um gegen Morgen zum Zeitpunkt des Erwachens ein Maximum zu erreichen (5).

Die Verschlechterung des Schlafs bei alten Menschen ist vergesellschaftet mit einer typischen Änderung der oben beschriebenen Muster endokriner Aktivität (6-9). Insbesondere die Hemmung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse, von engl. hypothalamo-pituitary-adrenal) und die GH-Ausschüttung nehmen mit zunehmendem Alter ab. Aus der verminderten nächtlichen Hemmung der HPA-Achse resultiert eine erhöhte Sekretion von Kortisol während der ersten Nachthälfte. Diese Änderungen stellen typische Kennzeichen der altersbedingten Verschlechterung endokriner Funktionen dar und haben klinische Bedeutung, indem sie zur erhöhten Morbidität alter Menschen beitragen (2,10). Die altersbedingte Enthemmung der Aktivität der HPA-Achse wird einer ge-

störten Rückkoppelung innerhalb des HPA-Systems zugeschrieben. Diese Störung der Rückkopplung verhindert die suffiziente Hemmung der HPA-Achse, die eines der wichtigsten stressvermittelnden Systeme des Menschen ist, und stellt wiederum ein indirektes Maß für die Langzeitfolgen belastender Ereignisse im Laufe eines Lebens dar. Der kumulative Effekt von vielen während eines Lebens auftretenden psychischen und physischen Belastungen wird auch als „allostatic load“ bezeichnet und stellt einen Faktor dar, der wesentlich bei der Entwicklung von altersassoziierten Störungen wie dem Metabolischen Syndrom und Gedächtnisstörungen beteiligt ist (10-13).

AVP ist nach kurzfristiger Gabe ein potenter Stimulus der Aktivität der HPA-Achse. In vivo wirkt AVP synergistisch mit dem corticotropic releasing-hormone (CRH) und reguliert so die hormonelle Vermittlung von verschiedenen Stressereignissen (14,15). Vor diesem Hintergrund stellten wir die Frage, ob die Verbesserung des Schlafs alter Menschen nach subchronischer AVP-Therapie mit einer erhöhten Aktivität der HPA-Achse während der Nacht erkauft wird. Dazu untersuchten wir die Wirkung einer subchronischen intranasalen AVP-Therapie bei alten Menschen auf den Schlaf und die assoziierte endokrine Aktivität der HPA- und somatotropen Achse. Darüber hinaus wurden mögliche unerwünschte Wirkungen von AVP auf Kreislauf und Wasserhaushalt evaluiert.

Material und Methoden

Versuchspersonen

Die Probanden wurden durch Zeitungsanzeigen angeworben. 42 Nichtraucher im mittleren Alter von 72.9 Jahren nahmen an der Studie teil. Sie waren gesund, versorgten sich selbst, nahmen keine Medikamente und hatten normalen Blutdruck. Kardiovaskuläre, metabolische, neurologische und psychiatrische Erkrankungen wurden durch Anamnese, körperliche Untersuchung, Routinelaboruntersuchungen einschließlich TSH und Ableiten eines EKGs ausgeschlossen. Ein Wert von <7 auf der Depressionsskala von Hamilton (16) wurde zum Ausschluss einer Depression herangezogen. Im Schlaflabor wurden weiterhin schlafbezogene Atemstörungen und Beinbewegungen ausgeschlossen. Die Versuchspersonen berichteten von milden Schlafstörungen, wie sie mit einem standardisierten Interview basierend auf einem englischsprachigen Fragebogen (PSQI, Pittsburgh Sleep Quality Index) erhoben wurden (17). Nach Einschluss in die Studie wurden die Probanden nach Alter, Geschlecht und Gewicht gleichmäßig auf zwei Behandlungsgruppen (Placebo: 9 Frauen, 10 Männer, mittleres Alter 73,0 Jahre, Body mass index (BMI) 26.7 ± 0.23 ; AVP: 10 Frauen, 6 Männer, mittleres Alter 72.8 Jahre, BMI 25.93 ± 0.20) verteilt.

Sieben der 42 Probanden beendeten die Studie vorzeitig aus persönlichen Gründen (2 Probanden) und wegen interkurrenter Erkrankungen (5 Probanden). Neun weitere Versuchspersonen mussten von der Auswertung der endokrinen Parameter wegen mehrerer fehlender Blutproben ausgeschlossen werden. Die Probanden wurden bezahlt und hatten der Teilnahme an der Studie nach Aufklärung zugestimmt. Die Ethikkommission der Universität Lübeck hatte gegen die Studie keine Bedenken erhoben.

Experimentelles Design

Die Probanden wurden im Schlaflabor nicht dem sonst üblichen Design mit festgelegten Licht-aus und Licht-an-Zeiten unterworfen, sondern konnten gemäß ihren Gewohnheiten selbst entscheiden, wie lange sie schlafen, wann sie zu Bett gehen oder wann sie aufstehen wollten. Diese Gewohnheiten sollten während der Studie beibehalten werden. Weitere Eigenheiten wie Lesen vor dem Zubettgehen oder Nachmittagsschlaf sollten ebenfalls nicht geändert werden.

Während der baseline-Periode von 2 Tagen wurden alle Probanden mit Placebo (physiologische Kochsalzlösung) behandelt. Nach der zweiten Nacht wurden sie für eine Behandlung mit AVP (Fa. Bachem, Heidelberg; gelöst in physiologischer Kochsalzlösung) oder Placebo randomisiert. Die Zuweisung zu den Behandlungsgruppen wurde doppelt blind vorgenommen. Die Therapie wurde als intranasales Spray mit je 2 Sprühstößen morgens nach dem Erwachen und abends eine Stunde vor dem Zubettgehen verabreicht. In der AVP-Gruppe enthielt jeder Sprühstoß 10 IE AVP. Die tägliche AVP-Dosis in der AVP-Gruppe betrug so 40 IE oder 100 µg. Die Probanden wurden angewiesen, die Fläschchen mit der Testsubstanz im Kühlschrank aufzubewahren. Obwohl die Integrität der Testsubstanz für 2 Wochen gegeben war, wurden die Fläschchen wöchentlich erneuert. Die gesamte Behandlungsdauer betrug 10 Wochen. Die beiden baseline-Nächte (Nacht 1,2) und die letzten 2 Tage des Behandlungszeitraums (Nacht 3,4) verbrachten die Probanden im Schlaflabor. Die Behandlung wurde abgebrochen, nachdem die Versuchspersonen das Spray das letzte mal am Abend der letzten Schlaflabornacht eingenommen hatten. In einer Untergruppe von 14 Probanden wurde eine weitere Untersuchungsnacht (Nacht 5) unmittelbar an die letzte Nacht unter Behandlung (Nacht 4) angeschlossen, um akute Absetzeffekte zu erfassen.

Die Probanden wurden für die Labornächte 3 Stunden vor dem gewünschten Licht-aus Zeitpunkt einbestellt. Nach den Vorbereitungen für die Schlafableitung und Blutentnahmen, bearbeiteten die Probanden eine Beschwerdeliste zur Erfassung von psychischen und physischen Beschwerden und Nebenwirkungen der Behandlung (18). Blutdruck und Puls wurden 30 Minuten

nach Ankunft im Schlaflabor, kurz vor dem Lichtlöschen und 10 Minuten nach dem Erwachen gemessen. Nachdem die Versuchspersonen zu Bett gegangen waren, wurde ihr Schlaf mittels Standardpolysomnographie (Ag/AgCl EEG Elektroden an C3 und C4 mit Referenz zur Nase) aufgezeichnet. Nacht 1 und 3 dienten der Gewöhnung an die Laborbedingungen. Während Nacht 2 und 4 wurde Blut über einen dünnen Plastikschlauch (Volumen 1.5 ml) aus einer Venenverweilkannüle am Unterarm entnommen. Der Schlauch wurde aus dem Schlafrum des Probanden durch ein Loch in der Wand in einen angrenzenden Raum geführt, um den Schlaf der Versuchspersonen nicht zu stören. Die Blutproben wurden im Abstand von 15 Minuten zur Messung von Kortisol und GH (Bestimmung mit RIA, Biermann, Deutschland) sowie alle 60 Minuten zur Messung von AVP (Bestimmung mit RIA, Bühlmann, Schweiz), Natrium, Osmolalität und einem kleinen Blutbild entnommen. Die Gesamtmenge entnommenen Bluts betrug 300 ml. Um die Gerinnung von Blut im Plastikschlauch zu verhindern, wurden insgesamt 300 ml physiologische Kochsalzlösung über die Nacht verteilt infundiert. 30 Minuten nach dem Erwachen bearbeiteten die Probanden einen Durchstreich-Test zur Evaluierung ihrer Aufmerksamkeit (19), anschließend wurde Stimmung und Aktiviertheit mit einer multidimensionalen Eigenschaftswörterliste (20) gemessen. Maße zur Evaluierung des Flüssigkeitshaushalts wurden in einer Untergruppe von 19 Probanden erfasst. Diese Versuchspersonen sammelten ihren Urin über 24 Stunden vor und am Ende des Behandlungszeitraums. Das spezifische Gewicht und die Urinosmolalität wurden getrennt für Tages- und Nachturin bestimmt. Am Morgen nach Nacht 2 und 4 wurde zudem das Gewicht gemessen und Blut zur Bestimmung von Kalium, Kalzium, Kreatinin, GOT, GPT, γ GT, Cholesterin, Triglyceride, Differentialblutbild und Insulin-like-growth factor (IGF)-1 entnommen.

Jeder Proband dokumentierte seine subjektive Einschätzung der Schlafqualität, Schlafdauer, Nykturiefrequenz und Tagschlafzeit in einem Tagebuch. Die subjektive Schlafqualität der vorangegangenen Nacht wurde mit einer 11-Punkte-Skala erfasst, die von -5 (sehr schlecht) bis +5 (ausgezeichnet) reichte. Schließlich wurden die Probanden wöchentlich zu Nebenwirkungen befragt, bei dieser Gelegenheit wurde auch Blutdruck und Puls gemessen.

Datenreduktion und Statistik

Die Schlafauswertung wurde nach den Kriterien von Rechtschaffen und Kales (21) von zwei erfahrenen Untersuchern vorgenommen, die nicht über die Zugehörigkeit der Probanden zu den Behandlungsgruppen informiert waren. Die Schlafauswertung wurde auf folgende Parameter reduziert: Einschlaf latenz (erstmaliges

Auftreten des Schlafstadium 1 gefolgt von Schlafstadium 2), Dauer der Schlafperiode (engl. SPT, sleep period time: Zeit vom Einschlafen bis Erwachen (letztmaliges Auftreten eines der Schlafstadien 1,2,3,4 oder REM)), Gesamtschlafzeit (engl. TST, total sleep time: Zeit, die in den Schlafstadien 1,2,3,4 und REM zwischen Einschlafen und Erwachen verbracht wurde), Schlaffeizienz (in %, SPT abzüglich Stadium „Wach“ im Verhältnis zur gesamten SPT), Dauer der einzelnen Schlafphasen „Wach“ (engl. WASO, wake after sleep onset), S1,2,3,4 und REM nach dem Einschlafen und Latenz bis zum erstmaligen Auftreten der Schlafphasen 1,2,3,4 und REM. Zusätzlich wurde die Dauer der einzelnen Schlafphasen getrennt für die erste und zweite Hälfte der SPT errechnet. Für Kortisol und GH wurden die Durchschnittsspiegel bezogen auf die gesamte Nacht sowie getrennt nach erster und zweiter Nachthälfte errechnet und die maximale und minimale (Nadir) Konzentration sowie die Latenz bis zum Auftreten der maximalen bzw. minimalen Konzentration ermittelt.

Die statistische Analyse der Daten beruhte auf einer ANCOVA (engl. analysis of covariance, Analyse der Kovarianz) mit einem Gruppenfaktor „Behandlung“ (AVP, Placebo). Die Daten der Nacht 2 dienten als Kovariate, die Daten der Nächte 4 und 5 waren die abhängige Variable. Die ANCOVA über wöchentlich erhobene Daten wie Blutdruck enthielt einen zusätzlichen Faktor „Zeit“. Effekte der Behandlung auf Nykturiefrequenz, Tagschlaf und subjektive Variablen sowie auf die Ergebnisse der Beschwerdeliste, des Konzentrationstest und der Eigenschaftswörterliste wurde mit non-parametrischen Tests ausgewertet. In Abhängigkeit von den Hypothesen wurden zwei- bzw. einseitige Tests eingesetzt. Ein $p < 0.05$ wurde als signifikant angesehen.

Ergebnisse

Schlaf

Während der baseline-Nächte waren beide Behandlungsgruppen bezüglich Einschlaf latenz, SPT, Schlaffeizienz und der Zeit, die in den einzelnen Schlafstadien verbracht wurde, vergleichbar. Die Probanden zeigten in der Nacht 2 sowie in der Nacht 4 unter Placebo-Behandlung den typischen Schlaufaufbau alter Menschen, sie verbrachten längere Phasen wach oder im Schlafstadium 1 bei gleichzeitig reduzierten Anteilen von Tief- und REM-Schlaf. In der Nacht 4 nach 10 Wochen Behandlung mit AVP war die Tiefschlafzeit im Vergleich zu Placebo um durchschnittlich 21.5 Min. signifikant verlängert ($p < 0.02$, Tabelle 1, Abb. 1). SPT und REM Latenz waren ebenfalls verlängert (im Durchschnitt um 18.9 Min. bzw. 11.6 Min.). Diese Effekte waren jedoch wegen einer hohen Varianz nicht

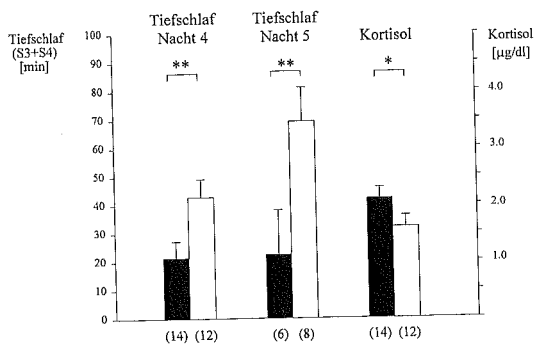


Abb. 1: Wirkungen von AVP auf Tiefschlaf und Kortisol-Nadirwerte
Mittelwerte ($\pm$ SEM) der Zeit, die im Tiefschlaf verbracht wurde und der Kortisol-Nadirwerte nach einer zehnwöchigen Behandlung mit intranasalem AVP (weiße Balken) und Placebo (schwarze Balken) bei 26 alten Menschen. Die Wirkungen auf den Tiefschlaf sind getrennt für die Nacht 4 (letzte Nacht der Behandlung) und die Nacht 5 (24 Stunden nach Beendigung der AVP-Therapie) dargestellt. Die Stichprobengröße ist unter den Balken angezeigt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$ für Vergleiche mit Placebo (ANCOVA).

	Nacht 4 (letzte Nacht der Therapie)					p	Nacht 5 (erste Nacht nach Beendigung der Therapie)					p
	Placebo (n=14)		AVP (n=12)		Placebo (n=6)		AVP (n=8)					
	MW	SEM	MW	SEM	MW		SEM	MW	SEM			
Schlaf latenz (min)	25.1	6.2	37.5	6.7		20.2	4.9	17.5	4.2			
Schlafperiode (SPT, min)	397.3	19.1	416.2	20.6		437.8	27.3	512.9	23.9		<0.04	
Gesamtschlafzeit (TST, min)	320.7	20.3	330.2	19.9		370.9	22.2	450.5	24.9		<0.04	
Schlafeffizienz (%)	80.6	2.5	79.6	2.9		84.7	3.0	87.5	3.8			
REM Latenz (min)	44.8	13.4	45.2	14.4		40.6	21.2	101.4	18.1		<0.05	
Dauer der Schlafstadien (Min)												
WASO	76.6	13.8	86.0	15.0		66.9	19.2	62.4	16.6			
S1	46.6	9.8	42.5	10.6		60.5	12.9	47.7	11.2			
S2	204.0	12.3	184.5	13.3		213.1	13.4	252.3	14.2		<0.07	
S3	21.7	5.2	35.4	5.7	<0.05	18.0	15.2	56.1	12.9		<0.05	
S4	0.2	2.9	14.2	3.2		5.3	3.0	10.4	2.5			
Tiefsschlaf (S3+S4)	21.3	5.9	42.8	6.4	<0.02	22.3	15.9	69.3	11.9		<0.02	
REM	48.8	5.5	60.4	5.5		75.0	14.5	81.2	13.3			
M	20.2	2.2	16.1	2.4		18.9	2.2	17.6	3.7			
Anteil der Schlafstadien in der ersten Nachthälfte (%)												
WASO	15.4	4.2	19.9	4.6		14.2	4.9	11.4	3.7			
S1	10.8	1.2	8.8	1.3		13.3	4.4	8.9	1.1			
S2	57.0	3.0	47.9	3.3	<0.02	53.3	6.5	45.2	3.8			
S3	7.7	2.1	11.3	2.3		4.2	4.8	14.1	4.1			
S4	0.0	1.0	2.6	1.1	<0.03	1.7	2.4	4.2	1.0			
Tiefschlaf (S3+S4)	7.7	2.4	13.8	2.6	<0.05	5.9	6.0	18.3	3.3		<0.05	
REM	9.1	1.4	9.7	1.5		13.3	2.8	16.2	2.4			
M	5.0	0.6	2.8	0.6		3.8	0.5	4.2	0.9			
Anteil der Schlafstadien in der zweiten Nachthälfte (%)												
WASO	20.6	4.1	22.0	4.5		16.1	4.5	14.5	3.9			
S1	12.3	1.5	11.6	1.6		14.7	1.6	11.5	1.4			
S2	46.3	3.4	40.8	3.7		45.1	3.2	52.2	2.8		<0.06	
S3	5.0	2.1	5.3	2.3		2.6	2.2	4.5	1.8			
S4	0.1	0.1	1.3	0.1		0.6	1.0	0.8	0.2			
Tiefschlaf (S3+S4)	5.1	2.2	6.6	2.4		3.2	1.4	5.3	1.0			
REM	15.7	2.0	19.0	2.2		20.9	4.3	16.5	3.8			
M	5.7	0.1	4.6	0.1		4.2	0.3	2.8	0.6			

Tabelle 1, Schlafparameter: Links (Nacht 4): Baseline-korrigierte Mittelwerte ($MW \pm SEM$) der Schlafparameter von 26 gesunden alten Menschen nach 10 Wochen intranasaler Behandlung mit AVP oder Placebo. Der Schlaf wurde in der Nacht nach der letzten intranasalen Behandlung untersucht (Nacht 4). Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Effekten der Behandlung und Unterscheide mit einem Trend zur Signifikanz ($p < 0.1$) sind dargestellt. Rechts (Nacht 5): In einer Untergruppe von 14 Probanden wurden Absetzeffekte in der Nacht untersucht, die der letzten Nacht unter Behandlung mit AVP folgte. Alle gezeigten Werte sind baseline korrigiert und einer ANCOVA entnommen (Siehe Datenreduktion und Statistik).

signifikant. Die Zunahme der Tiefschlafzeit nach AVP war assoziiert mit einer Verkürzung von Schlafstadium 2 vor allem während der ersten Nachthälfte ($p < 0.02$).

In einer Untergruppe von 14 Probanden wurde der Schlaf 24 h nach Beendigung der AVP-Behandlung (Nacht 5) untersucht, diesmal ohne nächtliche Blutentnahme. SPT und Tiefschlafzeit waren deutlich verlängert, was am ehesten auf den Wegfall der störenden Einflüsse der nächtlichen Blutentnahmeprozedur zurückzuführen war. Die Zunahme der Tiefschlafzeit persistierte nicht nur einen Tag nach Beendigung der AVP-Therapie, sondern war nahezu verdoppelt (Tabelle 1, Abb. 1). Die SPT war während dieser Nacht um durchschnittlich 75 Min. gegenüber der Placebo-Gruppe verlängert ($P < 0.04$). Zudem wurde in der Nacht 5 eine signifikant verlängerte REM-Latenz in der AVP-Gruppe beobachtet ($p < 0.05$).

Kortisol, GH und IGF-1

Wie erwartet waren die Kortisol-Konzentrationen während der ersten Nachthälfte niedriger als in der zweiten Nachthälfte. Es gab keine Hinweise auf eine Erhöhung der Kortisolspiegel unter AVP-Behandlung. Im Gegenteil, obwohl unsere Gruppe von alten Menschen nur leicht erhöhte Kortisol-Nadir-Konzentrationen im Vergleich zu jungen Menschen zeigte, kam es unter AVP-Therapie zu einer verstärkten Suppression der Kortiso-

lausschüttung. Dies drückte sich in einer Reduktion des Kortisol-Nadirs um $0.5 \mu\text{g/dl}$ entsprechend 23.8% aus ($p < 0.04$, Tabelle 2). Unter baseline- und Placebobedingungen waren die GH-Spiegel wie erwartet niedriger als bei jungen Menschen (Tabelle 2). Nach AVP-Behandlung nahmen die durchschnittlichen GH-Spiegel während der SPT um 0.8 ng/ml zu, was nur einen Trend zur Signifikanz ergab ($p < 0.08$). Dieselbe Tendenz zu verstärkter GH-Ausschüttung nach AVP wurde bei getrennter Analyse der Nachthälften für die zweite Nachthälfte gefunden (Tabelle 2). Die Konzentrationen von IGF-1 wurden am Morgen nach den experimentellen Nächten gemessen und spiegelten keinen Effekt der AVP-Behandlung wider (Mittelwert (MW) $\pm$ SEM AVP: $88.3 \pm 4.9 \text{ pg/ml}$; Placebo: $84.8 \pm 4.4 \text{ pg/ml}$).

Wasserhaushalt und Routinelabor-Parameter

Die Plasmakonzentrationen von AVP in der Nacht 4 waren unter AVP-Behandlung zum Zeitpunkt des Lichtlöschens signifikant gegenüber Placebo erhöht, da kurz vorher das Peptid intranasal verabreicht worden war (MW $\pm$ SEM AVP: $4.16 \pm 0.75 \text{ pg/ml}$; Placebo: $1.55 \pm 0.61 \text{ pg/ml}$, Abb. 2). Im weiteren Verlauf der Nacht nahmen die AVP-Spiegel kontinuierlich ab, um am Morgen das Niveau der AVP-Spiegel der Placebo-Gruppe zu erreichen (MW $\pm$ SEM AVP: $2.84 \pm 0.49 \text{ pg/}$

	Placebo (n=14)		AVP (n=12)		p
	MW	SEM	MW	SEM	
GH (ng/ml)					
Maximum	2.2	0.8	3.7	0.8	
Maximum-Latenz (Min)	94.2	28.3	97.0	28.4	
Durchschnittsspiegel während:					
SPT	1.0	0.2	1.8	0.2	< 0.08
Erste Nachthälfte	1.1	0.3	1.6	0.3	
Zweite Nachthälfte	0.9	0.1	1.2	0.1	< 0.08
Kortisol ($\mu\text{g/dl}$)					
Maximum	16.2	1.1	16.1	1.1	
Maximum-Latenz (Min)	290.9	28.2	329.1	29.0	
Nadir	2.1	0.2	1.6	0.2	< 0.04
Nadir-Latenz (Min)	113.3	12.9	99.7	13.5	
Durchschnittsspiegel während:					
SPT	6.8	0.4	6.8	0.4	
Erste Nachthälfte	4.1	0.4	3.7	0.5	
Zweite Nachthälfte	8.9	0.7	10.0	0.7	

Tabelle 2, Endokrine Parameter: Baseline korrigierte Mittelwerte (MW $\pm$ SEM) der endokrinen Parameter während des Nachtschlafs alter Versuchspersonen nach 10 Wochen intranasaler Therapie mit AVP oder Placebo. Maximale Konzentrationen von GH und Kortisol und Maximum-Latenzen in Bezug auf „Licht aus“ sowie Nadir-Konzentrationen von Kortisol und Kortisolnadir-Latenz sind dargestellt. Die Durchschnittskonzentration von GH und Kortisol wurden für die SPT (engl. sleep period time, Dauer der Schlafperiode) und getrennt für die erste und zweite Nachthälfte bestimmt. Paarweise Vergleiche der dargestellten Parameter sind einer ANCOVA entnommen.

AVP

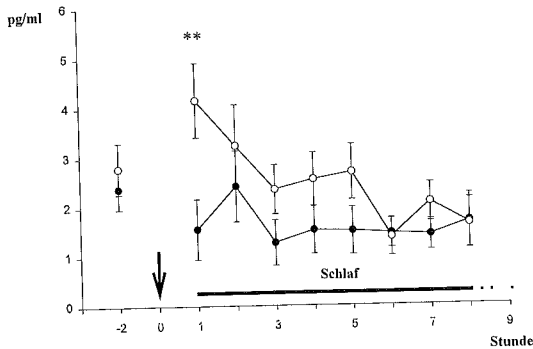


Abb. 2: Nächtliche Plasma AVP-Spiegel

Plasmakonzentrationen von AVP, stündlich gemessen während einer Nacht nach 10 Wochen intranasaler Therapie mit einer täglichen Dosis von 40 IE AVP (offene Kreise, $n=14$) oder Placebo (geschlossene Kreise, $n=12$). Das Spray wurde eine Stunde vor dem Lichtlöschen appliziert (schwarzer Pfeil, Stunde 0). Zudem sind die Messwerte 2 Stunden vor der abendlichen Applikation des Peptides angegeben. Der schwarze Balken entspricht der Dauer der Schlafperiode. $** < 0.01$ für paarweise Vergleiche zwischen den Behandlungseffekten.

ml; Placebo: 1.71 ± 0.44 pg/ml, $p < 0.1$). Die Messungen von Serum-Natrium, Osmolalität und Hämatokrit ergaben zu keinem Zeitpunkt Abweichungen vom Normbereich, Hinweise auf Behandlungseffekte fanden sich nicht (Tabelle 3). Die Serum-Natriumkonzentration

nahm zum Ende der Nacht hin zu, während Osmolalität und Hämatokrit leicht abnehmen. 16 Probanden mussten wegen Sammelfehler von der Analyse der Urin-Parameter ausgeschlossen werden. Bei den verbliebenen Versuchspersonen war die abgegebene Urinmenge in beiden Behandlungsgruppen vergleichbar. Osmolalität und spezifisches Gewicht in den abgegebenen Urinproben zeigten keine Behandlungseffekte. Das Körpergewicht änderte sich nicht signifikant unter AVP-Therapie. Auch die am Morgen nach den experimentellen Nächten bestimmten Routinelabor-Parameter (Kalium, Kalzium, Kreatinin, GOT, GPT, γ GT, Cholesterin, Triglyceride und Differentialblutbild) zeigten keine Veränderungen unter AVP-Behandlung.

Kardiovaskuläre Parameter

Der systolische Blutdruck war vor dem Lichtlöschen in der AVP-Gruppe leicht erhöht (Tabelle 4), vermutlich infolge der intranasalen Applikation von AVP eine Stunde zuvor. Am Morgen nach den experimentellen Nächten – aber auch am Abend vor Spray-Einnahme – waren die Blutdruckwerte bei Placebo und AVP-behandelten Probanden nicht-signifikant verschieden. Diastolischer Blutdruck und Pulsfrequenz zeigten zu keinem Zeitpunkt Behandlungseffekte. Die Messung des Blutdrucks und der Herzrate einmal wöchentlich während des Behandlungszeitraums ergab Normalwerte und keine mit der Behandlung assoziierten Unterschiede.

Selbstbeurteilung, Aufmerksamkeit und Schlaf-tagebuch

Die Beschwerdeliste zeigte nur allgemeine, milde Störungen des körperlichen und geistigen Wohlbefindens,

	Placebo		AVP	
	MW	SEM	MW	SEM
Urin	(n=9)		(n=10)	
Tagesmenge (ml)	733	153	875	97
Nachtmenge	479	53	627	91
Osmolalität (mosmol/kg)	700	93	596	59
Spezifisches Gewicht	1024	3.1	1023	2.4
Plasmaparameter	(n=19)		(n=16)	
Natrium (mmol/L)	141.34	0.39	141.18	0.42
Osmolalität (mosmol/kg)	293.8	1.0	292.9	1.0
Hämatokrit	0.373	0.005	0.365	0.006

Tabelle 3, Flüssigkeitshaushalt: Urinvolumen, Osmolalität, spezifisches Gewicht und Plasmaparameter des Flüssigkeitshaushalts nach 10 Wochen intranasaler Therapie mit AVP oder Placebo. Urin wurde vom Morgen nach der Eingewöhnungsnacht bis „Licht aus“ der experimentellen Nacht (Tagesurin) und von da an bis zum Morgen nach der experimentellen Nacht (Nachturin) gesammelt. Es sind Mittelwerte (MW $\pm$ SEM) einer ANCOVA dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen waren nicht signifikant.

	Placebo (n=19)		AVP (n=16)		p
	MW	SEM	MW	SEM	
Systolischer Blutdruck (mmHg)					
Vor Applikation	136.8	3.6	140.2	3.9	<0.05
1 h nach Applikation	126.3	3.8	138.6	4.1	
Nach dem Erwachen	134.1	2.8	138.5	3.1	
Diastolischer Blutdruck (mmHg)					
Vor Applikation	82.1	2.4	82.9	2.6	
1 h nach Applikation	76.2	2.1	75.8	2.2	
Nach dem Erwachen	78.3	2.3	80.5	2.5	
Pulsfrequenz (Schläge/min)					
Vor Applikation	72.3	2.3	73.3	2.5	
1 h nach Applikation	66.2	1.6	66.1	1.7	
Nach dem Erwachen	68.2	2.1	70.0	2.3	

Tabelle 4, Kardiovaskuläre Parameter: Baseline korrigierte Mittelwerte (MW±SEM) von Blutdruck und Puls nach 10 Wochen Therapie mit intranasalem AVP oder Placebo (ANCOVA). Es sind die Werte für die paarweisen Vergleiche zwischen den Effekten von AVP und Placebo dargestellt.

die nicht durch Behandlungseffekte erklärbar waren. Die Erhebung der aktuellen Befindlichkeit mit der Eigenschaftswörterliste und die Messung der Aufmerksamkeit mit dem Durchstreich-Test ergaben keine Hinweise auf einen Therapieeffekt unter AVP. Tabelle 5 fasst die Ergebnisse des Tagebuchs zusammen, das die Probanden während der zehnwöchigen Behandlungsperiode führten. Für die berichtete Schlafzeit wurde ein Mittelwert vom gesamten Behandlungszeitraum und von den ersten 14 bzw. letzten 14 Tagen errechnet. Die Zeitpunkte des Zubettgehens und Aufstehens wurden ebenfalls erfasst. Insgesamt wurden diese Parameter nicht von der AVP-Behandlung beeinflusst. Die selbst eingeschätzte Schlafqualität sowie Häufigkeit und Dauer von Tagschlafepisoden änderten sich ebenfalls nicht. Die Häufigkeit nächtlichen Wasserlassens war gering und wurde durch die AVP-Therapie nicht gesenkt (MW±SEM AVP: 1.04±0.23; Placebo: 0.83±0.13).

Diskussion

Die vorliegende Studie untersuchte Wirkungen einer täglichen, intranasalen AVP-Therapie über 10 Wochen auf Schlaf und schlafassoziierte endokrine Aktivität bei gesunden alten Menschen. Während der baseline-Nächte zeigten die Probanden die charakteristischen altersassoziierten Veränderungen in ihrer Schlafarchitektur, wie sie in früheren Studien beschrieben wurden (2,6-10,22). 10 Wochen intranasaler Behandlung mit AVP vermehrten die Tiefschlafzeit erheblich, im Durchschnitt um 21.5 Min. In der Nacht nach Absetzen der Therapie trat kein Rebound der Schlafstörungen auf, die Tiefschlafzeit war im Gegenteil nochmals verlängert im Vergleich mit der Placebo-Gruppe. Ein

besonders wichtiges Ergebnis war, dass die AVP-Behandlung keine Zeichen einer Aktivierung der HPA-Achse während des Schlafs hinterließ. Sie verstärkte im Gegenteil die Inhibition der HPA-Achse im frühen Nachtschlaf, was sich in einer signifikant reduzierten Kortisolausschüttung in diesem Zeitraum widerspiegelte. Darüberhinaus war die Zunahme des Tiefschlafs unter AVP mit einer Tendenz zu vermehrter Ausschüttung von GH während des Schlafs vergesellschaftet. Es gab keine Hinweise für Nebenwirkungen der subchronischen AVP-Therapie auf das Herz-Kreislaufsystem und den Wasserhaushalt.

Die Schlafveränderungen in der vorliegenden Studie konzentrierten sich hauptsächlich auf den Tiefschlaf, der im Durchschnitt um 21.5 Min. zunahm und von einer Abnahme der Zeit im Schlafstadium 2 während der ersten Nachthälfte begleitet wurde. Diese Ergebnisse bestätigen Daten einer früheren Studie, die eine Zunahme des Tiefschlafanteils von durchschnittlich 22 Min. bei alten Menschen nach dreimonatiger Behandlung mit AVP zeigte (3). In dieser Studie waren auch die Gesamtschlafzeit und der REM-Schlaf signifikant um 41 bzw. 10 Min. verlängert. In der vorliegenden Studie nahmen Gesamtschlafzeit und REM-Schlaf unter AVP um 9.5 bzw. 11.6 Min. zu. Die Veränderungen waren jedoch nicht statistisch signifikant, weil die Daten eine große Streuung zeigten. Dieses Problem wurde vermutlich durch die permanenten Blutentnahmen während der Nacht verursacht, die in der vorgenannten Studie nicht stattfanden und die für die Probanden trotz sorgfältiger Vorbereitung und Einweisung eine zusätzliche Belastung darstellten. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Nacht 5 weiter gestützt. 24 Stunden nach Beendigung der AVP-Therapie wurde in

	Placebo (n=19)		AVP (n=16)	
	MW	SEM	MW	SEM
Gesamtschlafzeit (h:min)				
Gesamte Behandlungsperiode	7:41	0:11	7:37	0:12
Tag 1-14	7:47	0:12	7:46	0:11
Tag 56-70	7:39	0:11	7:37	0:11
Nykturie (Häufigkeit/Nacht)				
Gesamte Behandlungsperiode	0.83	0.13	1.04	0.23
Tag 1-14	1.05	0.19	1.07	0.24
Tag 56-70	0.65	0.10	1.07	0.25
Schlafqualität (-5 bis +5)				
Gesamte Behandlungsperiode	+2.15	0.54	+2.00	0.49
Tag 1-14	+1.81	0.56	+2.07	0.55
Tag 56-70	+2.46	0.59	+2.13	0.50
Tagschlafdauer (Min)				
Anzahl der Probanden mit Tagschlaf		6		6
Gesamte Behandlungsperiode	30.0	8.2	20.0	4.6
Tag 1-14	29.8	8.1	20.3	4.5
Tag 56-70	32.4	8.5	19.4	7.2

Tabelle 5, Tagebuchberichte: Mittelwert (MW±SEM) der berichteten Gesamtschlafzeit, Nykturiefrequenz, Schlafqualität und Dauer des Tagschlafs nach 10 Wochen Behandlung mit intranasalem AVP oder Placebo. Der Tagschlaf wurde nur für Probanden analysiert, die mehr als 2 mal pro Woche über Tagschlaf berichteten. Durchschnittswerte für die gesamte Behandlungsperiode von 10 Wochen als auch für die ersten 14 und die letzten 14 Tage des Behandlungszeitraums sind gezeigt. Paarweise Vergleiche der Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen waren nicht signifikant.

einer Untergruppe nochmals der Schlaf abgeleitet, jedoch kein Blut entnommen. Allgemein schliefen sowohl die Probanden unter Placebobedingung als auch die AVP behandelten Versuchspersonen in der Nacht 5 besser. Der Effekt von AVP auf den Tiefschlaf blieb jedoch nicht nur erhalten, er nahm sogar noch zu, so dass die Probanden der AVP-Gruppe durchschnittlich 47.0 Min. länger im Tiefschlaf verbrachten als die Probanden der Placebo-Gruppe. Außerdem zeigte die AVP behandelte Gruppe eine signifikant verlängerte REM-Latenz und Gesamtschlafzeit (durchschnittlich 79 Min.). Die Ergebnisse der Nacht 5 sind noch aus einem weiteren Grund interessant. Obwohl die Behandlung mit AVP 24 Stunden zuvor abgesetzt worden war, kam es nicht zu einem Wiederauftreten (rebound) der Schlafstörung. Dies ist insofern von Bedeutung, da Substanzen, die zur Therapie von Schlafstörungen häufig eingesetzt werden wie Benzodiazepine starke rebound-Effekte nach Beendigung der Therapie zeigen (23,24).

Die signifikante Abnahme der Kortisol-Nadirkonzentration während der ersten Nachthälfte erscheint vor dem Hintergrund bemerkenswert, dass unsere Gruppe von alten Menschen unter baseline-Bedingungen nicht die erhöhten Kortisolspiegel erreichten, wie sie in vergleichbaren Studien mit alten Menschen berichtet wur-

den (7,9). Obwohl die Kortisol-Nadirkonzentrationen im Vergleich zu jungen Probanden leicht erhöht waren, erschienen sie nach einer vorliegenden Studie (9) eher repräsentativ für eine Gruppe von Menschen im Alter von 51-60 Jahren zu sein und nicht für die 68- bis 87jährigen unseres Kollektivs. Deshalb charakterisieren die Kortisol-Nadirwerte unsere Probanden als eine ziemlich jugendliche Stichprobe. In diesem Licht bedeutet die Reduktion der Kortisol-Nadirwerte einen verstärkenden Einfluss der subchronischen AVP-Therapie auf die Hemmung der Aktivität der HPA-Achse, die bekanntermaßen während des frühen Nachtschlafs beobachtet wird und insbesondere mit Episoden des Tiefschlafs assoziiert ist (4,25,26). Diese Hemmung wird wahrscheinlich unter der übergeordneten Kontrolle limbischer Systeme auf die HPA-Achse ausgeübt und schwächt sich im Laufe des Alterns ab (7-9).

Zwei Faktoren sind wichtig, um die überraschenden Ergebnisse eines keineswegs stimulierenden, sondern deutlich hemmenden Einflusses von AVP auf die HPA-Achse während des Schlafs zu interpretieren: Die Dauer der Behandlung und die intranasale Applikation von AVP. Frühere Studien deuteten auf unterschiedliche Wirkungen von AVP in Abhängigkeit von akuter oder subchronischer Applikation. Nach akuter Gabe

von AVP wurde eine Verschlechterung des Schlags beobachtet (27), unter subchronischer AVP-Therapie jedoch eine Verbesserung (3). Dementsprechend hängt der verstärkende Effekt auf die Inhibition der HPA-Achse vermutlich mit der subchronischen Applikationsdauer zusammen. Zudem hat die Nutzung der intranasalen Route den Vorteil, AVP in viel höherer Dosierung verabreichen zu können, als es die intravenöse Applikation erlaubt. Da eine direkte Verbindung zwischen der Nase und dem Gehirn unter Umgehung der Blut-Hirnschranke besteht, erleichtert die intranasale Applikation Wirkungen von AVP auf zentralnervöse Prozesse (28,29). Eine direkte Wirkung von AVP auf Hirnstrukturen wird von Untersuchungen nahegelegt, die eine Akkumulation des Peptids im Liquor des Menschen nach intranasaler Applikation nachgewiesen haben (30).

Eine mögliche Erklärung, wie AVP sowohl Tiefschlaf vermehrt und gleichzeitig die Inhibition der HPA-Achse während des frühen Nachschlafs verstärkt, könnte in der Wirkung von AVP auf Kortikoidrezeptoren, insbesondere auf Mineralokortikoidrezeptoren (MR) liegen. Bei Ratten stimuliert AVP die Expression von Kortikosteroidrezeptoren in limbischen und hippocampalen Gehirnregionen (31). Die Blockierung von MR beim Menschen durch Canrenoat vermindert den Tiefschlaf und erhöht die Kortisolnadirwerte im frühen Nachtschlaf (32-35). Stimulation der MR dagegen vermehrt Tiefschlaf (36). Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse scheint es verlockend, die Verbesserung des Tiefschlafs und die verstärkte Hemmung der HPA-Achse nach subchronischer AVP-Therapie einer stimulierten Expression von limbisch-hippocampalen MR zuzuschreiben. Alternativ könnte die Behandlung mit AVP den altersbedingten Mangel an vasopressinergen Neuronen kompensieren, von dem bekannt ist, dass er selektiv den Nucleus suprachiasmaticus des Hypothalamus betrifft (37). Dieser Kern spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus (38). Erhöhte AVP Spiegel in dieser Region könnten den Schlaf durch eine Vergrößerung der Amplitude des Schlaf-Wach-Rhythmus verbessern. Ähnliche Mechanismen sind möglicherweise für die vermehrte nächtliche GH-Ausschüttung unter AVP verantwortlich, obwohl die beobachteten Effekte aufgrund großer Variabilität der Daten nicht signifikant waren.

Die vorliegende Studie diente nicht zuletzt dazu, mögliche Nebenwirkungen der intranasalen AVP-Behandlung auf Kreislauf und Wasserhaushalt zu erkennen. Der systolische Blutdruck nahm akut innerhalb einer Stunde nach Applikation von AVP zu. Diese Zunahme war jedoch klein und der Blutdruck blieb innerhalb des Normalbereichs. Parallele Veränderungen des diastolischen Blutdrucks oder der Pulsfrequenz wurden nicht beobachtet. Außerdem belegen die Blutdruckdaten, die

wöchentlich während des Behandlungszeitraums gesammelt wurden, keine tonische Erhöhung des Blutdrucks unter AVP. Auch diese Messwerte lagen durchgehend im Normbereich. Keine der Messungen zur Evaluierung des Wasserhaushalts wie Serum-Natrium, Osmolalität, Hämatokrit, Urinproduktion und Körpergewicht ergab einen Hinweis auf eine akute oder längerdauernde Änderung im Wasserhaushalt unter AVP-Behandlung. Deshalb können Langzeiteffekte auf Blutdruck und Wasserhaushalt unter AVP ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend sind die vorgelegten Ergebnisse vielversprechend, indem sie verbesserten Schlaf zusammen mit den Zeichen einer verbesserten Kontrolle über die Aktivität der HPA-Achse während des Schlafs demonstrieren. In Anbetracht der Bedeutung der Kortisol-Nadirwerte als indirektes Maß für den kumulativen Einfluss von belastenden Lebensereignissen auf geistige und körperliche Gesundheit (allostatic load) und in Anbetracht der kurzen Behandlungsdauer in dieser Studie im Vergleich zu dem langen Zeitraum, indem sich Störungen des Schlafs und der endokrinen Aktivität entwickelten, legen die hier beobachteten Ergebnisse dass eine signifikante Verbesserung der neuroendokrinen Architektur des Schlafs mit intranasalem AVP nahe.

Danksagung

Wir danken S. Baxmann, Ch. Zinke, A.-K. Jürs und A. Otterbein für die hervorragende technische Unterstützung.

Literatur

1. Kales A, Wilson T, Kales JD, Jacobsen A, Paulson MJ, Kollar E, Walter RD (1967) Measurements of all-night sleep in normal elderly persons: effects of aging. *J Am Geriatr Soc* 15: 405-414
2. Prinz PN, Vitiello MV, Raskind MA, Thorpy MJ (1990) Geriatrics: sleep disorders and aging. *N Engl J Med* 323: 520-526
3. Perras B, Pannenburg H, Marshall L, Pietrowsky R, Born J, Fehm HL (1999) Beneficial treatment of age-related sleep disturbances with prolonged intranasal vasopressin. *J Clin Psychopharmacol* 19: 28-36
4. Friess E, Wiedemann K, Steiger A, Holsboer (1995) The hypothalamic-pituitary-adrenocortical system and sleep in man. *Adv Neuroimmunol* 5: 111-125
5. Born J, Hansen K, Marshall L, Mölle M, Fehm HL (1999) Timing the end of nocturnal sleep. *Nature* 397: 29-30
6. van Coevorden A, Mockel J, Laurent E, Kerkhofs M, L'Hermite-Baleriaux M, Decoster C, Neve P, van Cauter E (1991) Neuroendocrine rhythms and sleep in aging men. *Am J Physiol* 260: E651-E661
7. Kern W, Dodt C, Born J, Fehm HL (1996) Changes in cortisol and growth hormone secretion during nocturnal sleep in the course of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 51: M3-M9

8. Deuschle M, Gotthardt U, Schweiger U, Weber B, Korner A, Schmider J, Standhardt H, Lammers CH, Heuser I (1997) With aging in humans the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal system increases and its diurnal amplitude flattens. *Life Sci* 61: 2239-2246
9. van Cauter E, Leproult R, Plat L (2000) Age-related changes in slow wave sleep and REM sleep and relationship with growth hormone and cortisol levels in healthy men. *JAMA* 284: 861-868
10. Seeman TE, Robbins RJ (1994) Aging and hypothalamic-pituitary-adrenal response to challenge in humans. *Endocr Rev* 15: 233-260
11. Lupien SJ, Nair NP, Briere S, Maheu F, Tu MT, Lemay M, McEwen BS, Meaney MJ (1999) Increased cortisol levels and impaired cognition in human aging: implication for depression and dementia in later life. *Rev Neurosci* 10: 117-139
12. Sapolsky R (1999) Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp Gerontol* 34: 721-732
13. McEwen BS (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance(I). *Brain Res* 886: 172-189
14. Aguilera G, Rabadan-Diehl C (2000) Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul Pept* 96: 23-29
15. Scott LV, Dinan TG (1998) Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life Sci* 62: 1985-1998
16. Hamilton M (1967) Development of a rating scale for primary depressive illness. *Br J Soc Clin Psychol* 6: 278-296
17. Buysse DJ, Reynolds CF, Monk TH, Berhan SR, Kupfer DJ (1989) The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res* 28: 193-213
18. von Zerssen D, Koeller DM, Rey ER (1970) Die Befindlichkeits-Skala (B-S) – ein einfaches Instrument zur Objektivierung von Befindlichkeits-Störungen, insbesondere im Rahmen von Längsschnitt-Untersuchungen. *Arzneimittel-Forsch* 20: 915-918
19. Brickenkamp R (1962) Aufmerksamkeits-Belastungs-Test (Test d2). Göttingen: Hogrefe
20. Janke W, Debus G (1978) Die Eigenschaftswörterliste EWL. Eine mehrdimensionale Methode zur Beschreibung von Aspekten des Befindens. Göttingen: Hogrefe
21. Rechtschaffen A, Kales A (1968) A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep of human subjects, NIH publ.no 204 ed. Washington, DC: US Govt. Printing Office
22. Corpas E, Harman SM, Blackman MR (1993) Human growth hormone and human aging. *Endocr Rev* 14: 20-39
23. Borbely AA, Akerstedt T, Benoit O, Holsboer F, Oswald I (1991) Hypnotics and sleep physiology: a consensus report. European Sleep Research Society, Committee on Hypnotics and Sleep Physiology. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 241: 13-21
24. Lader M (1994) Benzodiazepines. A risk-benefit profile. *CNS Drugs* 1: 377-387
25. van Cauter E, Leproult R, Kupfer DJ (1996) Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2468-2473
26. Bierwolf C, Struve K, Marshall L, Born J, Fehm HL (1997) Slow wave sleep drives inhibition of pituitary-adrenal secretion in humans. *J Neuroendocrinol* 9:479-484
27. Born J, Kellner C, Uthgenannt D, Kern W, Fehm HL (1992) Vasopressin regulates human sleep by reducing rapid-eye-movement sleep. *Am J Physiol* 262: E295-E300
28. Pietrowsky R, Struben C, Molle M, Fehm HL, Born J (1996) Brain potential changes after intranasal vs. intravenous administration of vasopressin: evidence for a direct nose-brain pathway for peptide effects in humans. *Biol Psychiatry* 39: 332-340
29. Fehm HL, Perras B, Smolnik R, Kern W, Born J (2000) Manipulating neuropeptidergic pathways in humans: a novel approach to neuropharmacology? *Eur J Pharmacol* 405: 43-54
30. Riekkinen P, Legros JJ, Sennet C, Jolkkonen J, Smits S, Soininen H (1987) Penetration of DGAVP (Org 5667) across the blood-brain barrier in human subjects. *Peptides* 8: 261-265
31. Veldhuis HD, de Kloet ER (1982) Vasopressin-related peptides increase the hippocampal corticosterone receptor capacity of diabetes insipidus (Brattleboro) rats. *Endocrinology* 110: 153-157
32. Wiedemann K, Lauer C, Loycke A, Pollmacher T, Durst P, Machter JP, Holsboer F (1992) Antiglucocorticoid treatment disrupts endocrine cycle and nocturnal sleep pattern. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 241: 372-375
33. Dodt C, Kern W, Fehm HL, Born J (1993) Antimineralocorticoid canrenoate enhances secretory activity of the hypothalamus-pituitary-adrenocortical (HPA) axis in humans. *Neuroendocrinology* 58: 570-574
34. Born J, Steinbach D, Dodt C, Fehm HL (1997) Blocking of central nervous mineralocorticoid receptors counteracts inhibition of pituitary-adrenal activity in human sleep. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1106-1110
35. Young EA, Lopez JF, Murphy-Weinberg V, Watson SJ, Akil H (1998) The role of mineralocorticoid receptors in hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 3339-3345
36. Friess E, Bardeleben V, Wiedemann K, Lauer CJ, Holsboer F (1994) Effects of pulsatile cortisol infusion on sleep-EEG and nocturnal growth hormone release in healthy men. *J Sleep Res* 3: 73-79
37. Swaab DF (1995) Ageing of the human hypothalamus. *Horm Res* 43: 8-11
38. Klein DC, Moore RY, Reppert SM (1991) Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock. New York, Oxford University Press

Insulin und Kognition

W. Kern

Nervenzellen sind bekanntlich in der Lage, Glukose auch ohne Anwesenheit von Insulin zu verstoffwechseln, weswegen das Gehirn traditionell als ein Insulin-unabhängiges Organ gilt. Aus diesem Grund haben sich die Insulinforscher in der Vergangenheit kaum für das Gehirn interessiert, weswegen die Diabetologie lange Zeit eine ziemlich „hirnlose“ Disziplin war. Dies änderte sich, als Ende der siebziger Jahre eine große Anzahl von Insulinrezeptoren im zentralen Nervensystem nachgewiesen wurde (1). Eine weitere wichtige Entdeckung war, dass Insulin über einen aktiven Transportmechanismus vom Blut über die Blutschranke ins Gehirn transportiert wird, wodurch es unter physiologischen Bedingungen stets zu parallelen Veränderungen der Insulinkonzentration im Blut und im Liquor kommt (2-4). Die höchsten Insulinrezeptordichten finden sich im Bulbus olfactorius, im Hippocampus, Hypothalamus und in Anteilen des limbischen Systems (1).

Auf zellulärer Ebene wurde in der Zwischenzeit eine Vielzahl von Insulinwirkungen an Neuronen nachgewiesen (1-3,5). So hemmt zum Beispiel Insulin die Entladungsrate von Neuronen im Hippocampus (6) und Hypothalamus (7, 8) und verringert die Wiederaufnahme von Noradrenalin in verschiedenen Gehirnzellen (9). Es beeinflusst den Katecholaminstoffwechsel im Hypothalamus (10) und stimuliert den Phosphoinositolumsatz im Hippocampus über eine Steigerung des adrenergen Tonus (11). Entgegen der traditionellen Meinung zeigen neuere Befunde, dass Insulin auch die Glukoseutilisation im Gehirn beeinflusst (12-14).

Obwohl vielfältige Insulineffekte auf verschiedene Funktion der Nervenzellen gut dokumentiert sind, ist die Bedeutung zentralnervöser Insulineffekte für die kognitive Funktion beim Menschen noch unklar. Diese Frage ist aber von entscheidender klinischer Bedeutung, wenn man bedenkt, dass bei Alzheimerpatienten eine erniedrigte Insulinkonzentration im Liquor nachgewiesen wurde und die Abnahme der Insulinkonzentration im Liquor mit dem Grad der Demenz korreliert (15). Auch bei Patienten mit Typ I oder Typ II Diabetes können Veränderungen der Insulinkonzentration sowohl im Sinne einer Hypo- oder Hyperinsulinämie bestehen. Der mögliche Einfluss veränderter Insulinkonzentrationen auf die Gehirnfunktion dieser Patienten im alltäglichen Leben (16-19) sowie auf die Entstehung einer

Hypoglykämiewahrnehmungsstörung (20) ist bisher noch kaum verstanden.

Wachsendes Interesse an den zentralnervösen Effekten des Insulins entstand auch durch neuere Beobachtungen, dass Insulin günstige Effekte auf die Gehirnfunktion haben könnte (21). So wurde zum Beispiel gezeigt, dass Insulin die Aussprossung von Dendriten fördert (22), dass es das Gehirngewebe vor den Auswirkungen einer Ischämie schützt (23) und dass es die Gedächtnisdefizite nach einer vorübergehenden Frontalhirnischämie bei Ratten reduziert (24). Ziel dieser Studie war deshalb die Klärung der Frage, ob das Insulin selbst auch beim Menschen günstige Einflüsse auf die Gehirnfunktion ausübt. Hierfür wurde der Einfluss unterschiedlich hoher Seruminsulinspiegel unter Konstanthaltung der Blutzuckerspiegel im Rahmen eines sogenannten euglykämischen Clamps auf akustisch evozierte Potentiale, sowie auf Aufmerksamkeitsprozesse und die Gedächtnisfunktion beim Menschen untersucht.

Versuchsdesign

Untersucht wurden 30 gesunde männliche Probanden im Alter zwischen 22 und 32 Jahren mit normalem Körpergewicht und ohne Diabetes in der Eigen- oder Familienanamnese. Alle Probanden waren Nichtraucher und nahmen keine Medikamente ein. Zehn Stunden vor der Versuchssitzung durften sie nichts mehr essen und keine koffein- oder alkoholhaltigen Getränke zu sich nehmen. Das Versuchsdesign wurde von der Ethikkommission der MUL geprüft und den Probanden in mündlicher und schriftlicher Form erläutert. Die Probanden wurden nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen eingeteilt. Nach einer Baselinephase wurde der einen Gruppe 1,5 mE Insulin pro kg Körpergewicht zu x min und der anderen Gruppe 15 mE Insulin pro kg x min über 360 Minuten infundiert. Der Blutzucker wurde gleichzeitig durch eine Glukoseinfusion auf dem Ausgangsniveau konstant gehalten. Die Experimente fanden in einem akustisch abgeschirmten Raum zwischen 8.00 und 16.00 Uhr statt, während die Probanden in aufrechter Position in einem Bett saßen. Eine Stunde vor der Testung wurde eine Venenverweilkanüle in eine Vene des Handrückens gelegt, der auf 45 Grad C erwärmt wurde, um arterialisiertes Blut für die Bestimmung der Blutzucker- und Seruminsulinspiegel zu erhalten. Eine zweite

Venenverweilkanüle wurde am anderen Arm plaziert, um Insulin und Glukose zu infundieren. Blutabnahmen erfolgten im fünf Minuten Abstand zur Bestimmung der Blutzuckerspiegel und im dreißig Minuten Abstand zur Messung der Seruminsulinspiegel. Die Blutentnahmen und die Infusionen erfolgten über ein Schlauchsystem vom Nebenraum aus, was eine Anpassung der Glukoseinfusionsrate ohne Notiz des Probanden ermöglichte. Auch die Blutentnahmen konnten so ohne Störung des Probanden durchgeführt werden. Durch diese Maßnahmen war der Proband nicht in der Lage, die experimentelle Behandlungsbedingung wahrzunehmen, und Störungen und Missemppfindungen wurden dadurch auf ein Minimum reduziert.

Am Ende der Baselinephase und alle neunzig Minuten während des euklykämischen Clamps wurden die folgenden kognitiven Standardtests durchgeführt:

Akustisch evozierte Potentiale (AEP). AEPs, die die verschiedenen Stufen der Reizverarbeitung widerspiegeln (25;26), wurden während einer Aufmerksamkeitsaufgabe (Oddball Paradigma) abgeleitet. Der Proband hatte die Aufgabe, seltene Zieltöne (1.200 Hz) zwischen häufigen Standardtönen (800 Hz) zu erkennen. Insgesamt wurden 400 Töne mit einem Interstimulusintervall zwischen 1.000 und 3.000 ms über Kopfhörer dargeboten. Der Proband hatte die Aufgabe, bei Erkennen eines Zieltons so schnell wie möglich mit dem Daumen der dominanten Hand einen Knopf zu drücken. Die Aufzeichnung der AEPs erfolgte wie in früheren Arbeiten beschrieben (27).

Gedächtnisleistung. Die Testung der Gedächtnisfunktion erfolgte durch Präsentation von Wortlisten mit jeweils 30 Worten. Die Worte entstammten drei verschiedenen semantischen Kategorien: Neutrale Worte, wie Baum oder Feld, Essensworte, wie Schinken oder Ei und emotionale Worte, wie Mutter oder Freund. Um wiederholte Testung zu ermöglichen wurden fünf verschiedene Wortlisten erstellt, mit jeweils zehn Worten aus jeder semantischen Kategorie. Die Wortlisten wurden vorgelesen und nach einer Pause von einer Minute sollte der Proband alle erinnerten Worte innerhalb einer Minute wiedergeben.

Stroop Test. Zur Testung der selektiven Aufmerksamkeit wurden die drei Untertests des Stroop Testes durchgeführt. Im sogenannten word reading Untertest wird dem Probanden eine Reihe von Farbnamen (grün, rot, blau, gelb), die in schwarzer Farbe geschrieben sind, und beim color naming Untertests eine Reihe von X, die in grün, rot, blau oder gelb gedruckt sind, präsentiert. Die Aufgabe besteht jeweils darin, so schnell wie möglich das Farbwort zu lesen bzw. die Farbe zu benennen. Für jeden Untertest wurde die Anzahl der innerhalb von 45 Sekunden korrekten Antworten bestimmt.

Der eigentliche Test zur selektiven Aufmerksamkeit ist der Interferenz Untertest (28). Dabei wird den Probanden eine Reihe von Farbnamen (grün, rot, blau, gelb) präsentiert, die aber in einer jeweils anderen Farbe gedruckt sind. Die Aufgabe besteht darin, möglichst schnell die Farbe, in der das Wort gedruckt ist, zu benennen, aber nicht das Farbwort vorzulesen. Die Anzahl von richtigen Antworten innerhalb von 45 Sekunden wurde bestimmt.

Vor dem ersten Experiment wurde dem Probanden zur Übung ein Satz aller Tests präsentiert. Für die experimentelle Testung standen fünf unterschiedliche Formen eines jeden Tests zur Verfügung.

Subjektives Befinden. Das subjektive Befinden der Probanden wurde anhand von Rating-Skalen im 15-Minuten Abstand erfasst.

Datenanalyse

Der Einfluss von niedrigen und hohen Seruminsulinspiegeln auf die verschiedenen Parameter wurde statistisch mittels Kovarianzanalysen, mit den Baselinewerten als Kovariate, ermittelt.

Die AEPs wurden getrennt für die verschiedenen experimentellen Bedingungen gemittelt:

Zeit der Aufzeichnung (Baseline, nach 90, 180, 270 und 360 Minuten Clamp), Behandlung (niedrige oder hohe Insulinspiegel), Topographie (Fz, Cz, Pz) und Tonart (Standard- oder Zielton). Das Mittelungsintervall beinhaltete eine 200 ms Baselinephase und ein 700 ms Poststimulusintervall. Aus den AEPs wurden die Latenzen und Amplituden für die Komponenten N1, P2 und P3 bestimmt. Auch die durchschnittliche Potentialamplitude zwischen 280 und 700 ms poststimulus, die sogenannte Slow Wave, wurde aus den AEPs der Zielöne ermittelt.

Insulineffekte auf die Gedächtnisleistung wurden wie bei den AEPs mittels Kovarianzanalysen untersucht, die einen zusätzlichen Faktor Wortkategorie (neutral, emotional, essensassoziiert) beinhalteten. Kovarianzanalysen wurden entsprechend für die Auswertung der verschiedenen Untertests des Stroop Tests und die Befindlichkeitsparameter verwendet.

Ergebnisse

Blutzucker und Seruminsulinspiegel

Unter Baselinebedingungen waren die Blutzuckerspiegel in beiden Gruppen nahezu identisch (niedriges Insulin: 5.31 ± 0.10 mmol/l; hohes Insulin: 5.20 ± 0.07 mmol/l) und blieben unverändert während der Insulinintusion (niedriges Insulin: 5.29 ± 0.10 mmol/l; hohes Insulin: 5.31 ± 0.10 mmol/l). Die Seruminsulinspiegel stiegen rasch von 42 ± 4.1 auf 543 ± 34 pmol/l in der niedrigen Insulinbedingung und von 45 ± 7.5 auf

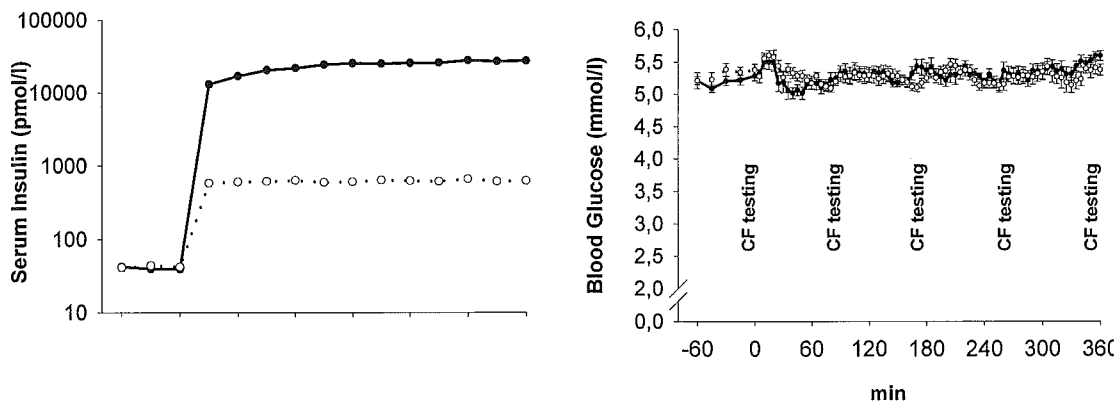


Abb. 1: Mittlere ($\pm$ SE) Blutzucker- und Seruminsulinkonzentration während Infusion von 1.5 mE/kg x min (weiße Kreise) und 15 mE/kg x min (schwarze Kreise). Die Zeiten der Testung der kognitiven Funktion (CF testing) ist gekennzeichnet. Die SEs der Seruminsulinkonzentration war durchweg kleiner als die Größe der Kreise.

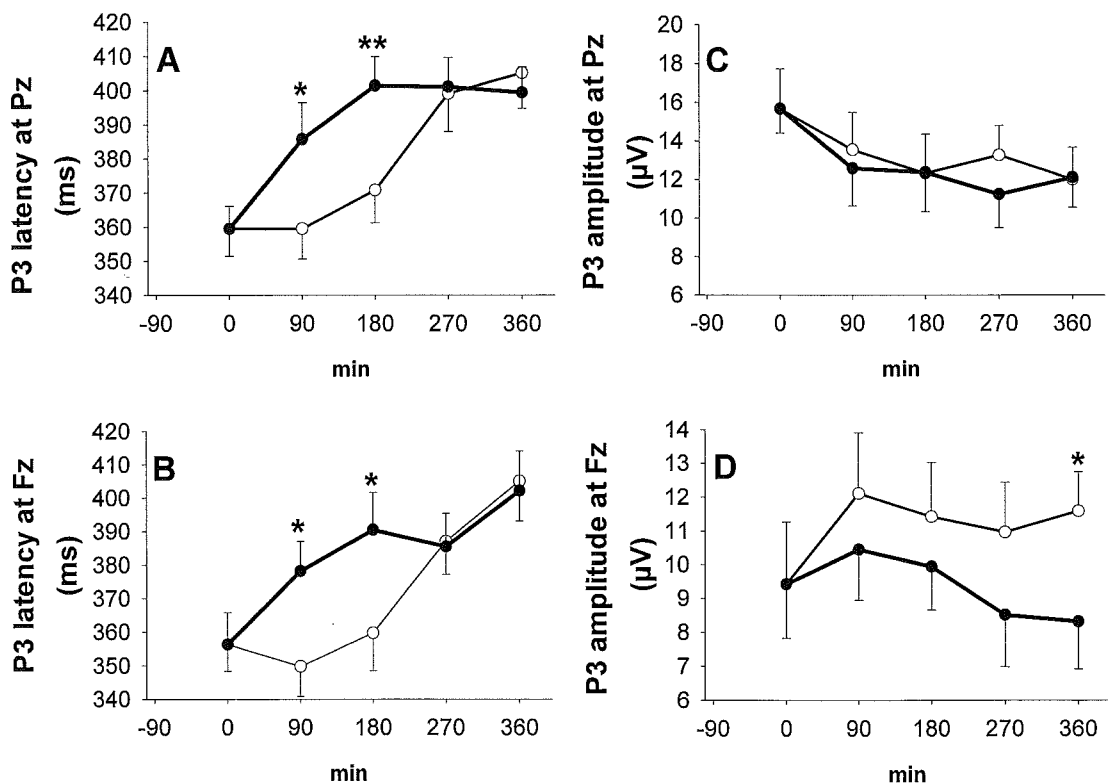


Abb. 2: Mittlere ($\pm$ SE) Latenz (A, B) und Baseline / Peak Amplitude (C, D) der P3 Komponente der AEPs über den parietalen (Pz) (A, C) und den frontalen (Fz) (B, D) Ableitorten. Die Ableitungen wurden unter Baselinebedingungen und alle 90 Minuten während konstanter Infusion von Insulin in einer Rate von 1.5 mE/kg x min. (weiße Kreise) und 15 mE/kg x min. (schwarze Kreise) durchgeführt. Die Werte sind gemäß der Kovarianzanalyse baseline adjustiert. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede zwischen der hohen und niedrigen Insulinbedingung: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$.

24.029 ± 1.595 pmol/l in der hohen Insulinbedingung (Gruppe: $p < 0.001$) (Abb. 1).

Akustisch evozierte Potentiale

Unter Baselinebedingungen unterschieden sich die verschiedenen Parameter nicht zwischen der niedrigen und hohen Insulinbedingung ($p > 0.2$). Es fanden sich keine Unterschiede in der Amplitude und Latenz der N1 und P2 Komponente des AEP's zwischen beiden Insulinbedingungen.

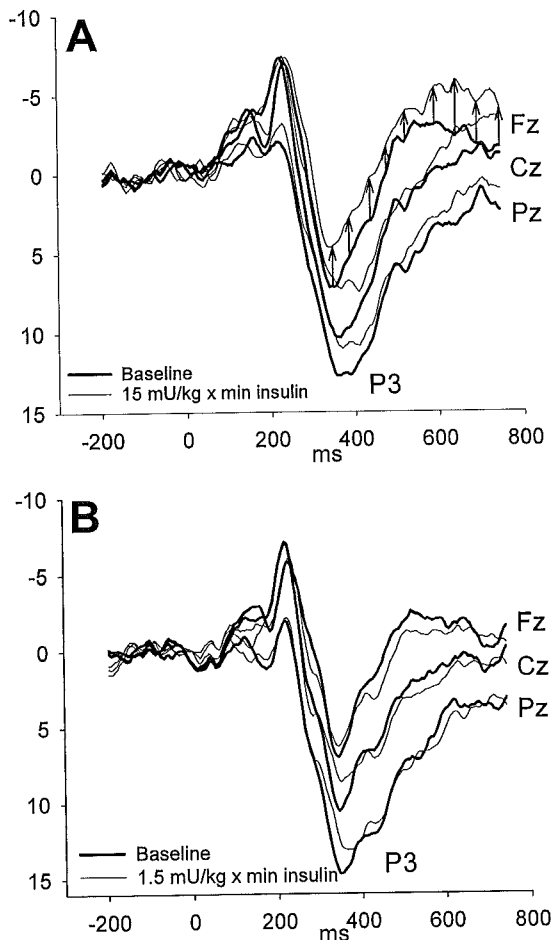


Abb. 3: Mittelwertskurven des AEPs unter der Baselinebedingung (dicke Linien) und nach 360 Minuten Insulininfusion (dünne Linien) in einer Rate von 15 mE/kg x min (A) und 1.5 mE/kg x min (B) abgeleitet über der frontalen (Fz), zentralen (Cz) und parietalen (Pz) Elektrodenposition. Die Pfeile kennzeichnen den deutlichen negativen Potentialshift über dem Frontalkortex, der nur unter hohen Seruminsulinspiegeln beobachtet wurde. Die Negativität ist nach oben aufgetragen.

Im Vergleich zur Baselinebedingung nahm die Latenz der P3 Komponente über Pz unter niedrigen Insulinspiegeln um 45.7 ms und unter hohen Insulinspiegeln um 40.0 ms bis zum Ende der Insulininfusion zu (Zeit: $p < 0.001$, Abb. 2). Die Zunahme der P3 Latenz trat unter hohen Seruminsulinspiegeln jedoch deutlich früher auf als unter niedrigen Seruminsulinspiegeln. So war die P3 Latenz signifikant länger unter hohen im Vergleich zu niedrigen Seruminsulinspiegeln nach 90 Minuten (hohes Insulin: 385.7 ± 10.7 ms; niedriges Insulin: $359.5 \pm$

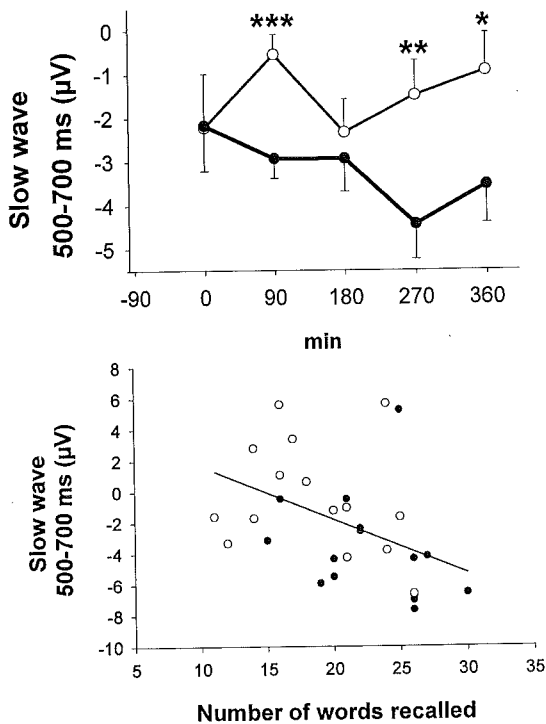


Abb. 4 A: Mittlere ($\pm$ SE) Durchschnittsamplitude des AEPs 500-700 ms nach Reizvorgabe über dem Frontalkortex (Fz), die unter Baselinebedingungen und alle 90 Minuten während konstanter Infusion von Insulin in einer Rate von 1.5 mE/kg x min (weiße Kreise) und 15 mE/kg x min (schwarze Kreise) abgeleitet wurden. Die Werte sind gemäß der Kovarianzanalyse baseline adjustiert. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede zwischen der hohen und niedrigen Insulinbedingung: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. B: Korrelation zwischen der Gesamtzahl der erinnerten Worte und der Durchschnittsamplitude des AEPs 500-700 ms nach Reizvorgabe, die über dem Frontalkortex nach 360 Minuten Insulininfusion in einer Rate von 1.5 mE/kg x min (weiße Kreise) und 15 mE/kg x min (schwarze Kreise) abgeleitet wurden. ($r = 0.40$, $p < 0.03$ über beide Insulinbedingungen).

8,9 ms, $p < 0.05$) und nach 180 Minuten (401.4 ± 8.5 ms; 370.8 ± 9.6 ms, $p < 0.01$) des Clamp Intervalls. Die Veränderungen der P3 Latenz über Fz und Cz waren vergleichbar mit denen über Pz. Die Höhe der Seruminsulinspiegel veränderte nicht die Baseline/Peak Amplitude der P3 über Pz (Abb. 2).

Über dem Frontalkortex (über Fz) bewirkten die hohen im Vergleich zu den niedrigen Insulinspiegeln einen ausgeprägten negativen Shift des evozierten Potentials (eine sogenannte slow wave), die am deutlichsten zum Ende des Clamp Intervalls ausgeprägt war. Zu diesem Zeitpunkt betrug die mittlere Differenz des AEPs 280-700 ms nach Reizvorgabe zwischen der hohen und niedrigen Insulinbedingung über Fz $-2.1 \mu V$ ($p < 0.05$) über Cz $-1.38 \mu V$ (n.s.) und über Pz $-0.16 \mu V$ (n.s.). Vergleichbare Veränderungen zeigten sich für die Durchschnittsamplitude über dem Frontalkortex bei getrennter Analyse des Zeitintervalls von 280-500 ms und von 500-700 ms nach Reizvorgabe (Abb. 3 und 4). Die Zunahme des negativen Potentialshifts über dem Frontalkortex unter hohen im Vergleich zu niedrigen Insulinspiegeln war bereits nach 90 Minuten Insulininfusion erkennbar (Durchschnittsamplitude, 280-700 ms, hohes Insulin: $0.27 \pm 0.48 \mu V$; niedriges Insulin $1.87 \pm 0.48 \mu V$, $p < 0.05$). Bis zum Ende des Clampintervalls nahmen diese Unterschiede weiter zu (Abb. 4). Da die negative slow wave mit dem Latenzintervall der P3 überlappte, war die P3 Amplitude über dem Frontalkortex unter hohem im Vergleich zu niedrigem Insulin deutlich reduziert (Abb. 2).

Gedächtnisleistung

In der niedrigen Insulinbedingung nahm die Gedächtnisleistung vermutlich als Ausdruck der Ermüdung während des Experiments ab. Dagegen nahm die Erinnerungsleistung unter hohen Seruminsulinspiegeln bis zum Ende des Clamps zu (Gesamtzahl der erinnerten Wörter, hohes Insulin: 22.04 ± 0.93 ; niedriges Insulin: 19.29 ± 0.92 , $p < 0.05$). Die Unterschiede in der Gedächtnisleistung zwischen beiden Gruppen scheint für die essensassoziierten und emotionalen Wörter deutlicher zu sein, die Kovarianzanalyse erbrachte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wortkategorien (Gruppe $\times$ Wortkategorie: $p > 0.06$). Bemerkenswert ist, dass die Erinnerungsleistung am Ende des Clampintervalls mit dem negativen Shift des evozierten Potentials 500-700 ms nach Reizvorgabe korrelierte ($r = -0.40$, $p < 0.03$; Abb. 4). Dies deutet darauf hin, dass eine Assoziation zwischen erhöhter Negativität im evozierten Potential über dem Frontalkortex und einer verbesserten Gedächtnisleistung bestehen könnte.

Stroop Test

Die Zahl der korrekten Antworten im word reading und color naming Untertest des Stroop Tests war in beiden

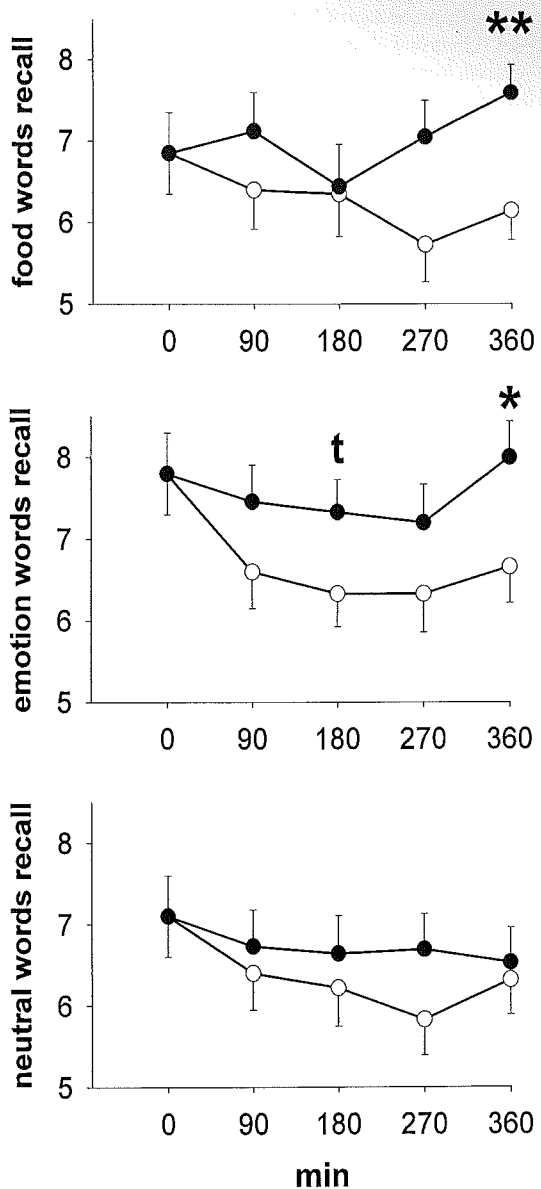


Abb. 5: Mittlere ($\pm$ SE) Anzahl richtig erinnelter Worte von einer Liste mit zehn essensassoziierten, zehn emotionalen und zehn neutralen Worten. Die Erinnerungsleistung wurde gemessen unter Baselinebedingungen und alle 90 Minuten während konstanter Infusion von Insulin in einer Rate von $1.5 \text{ mE/kg} \times \text{min}$ (weiße Kreise) und $15 \text{ mE/kg} \times \text{min}$ (schwarze Kreise). Die Werte sind gemäß der Kovarianzanalyse baseline adjustiert. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede zwischen der hohen und niedrigen Insulinbedingung: $t = p < 0.1$, * $= p < 0.05$, ** $= p < 0.01$.

Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Im Interferenz Untertest war am Ende des Clampintervalls die Anzahl korrekter Antworten unter hohen Seruminsulinspiegeln jedoch deutlich besser als unter niedrigen Seruminsulinspiegeln (korrekte Antworten, hohes Insulin: 67.10 ± 2.16 ; niedriges Insulin: 59.75 ± 2.16 , $p < 0.05$; Abb. 6).

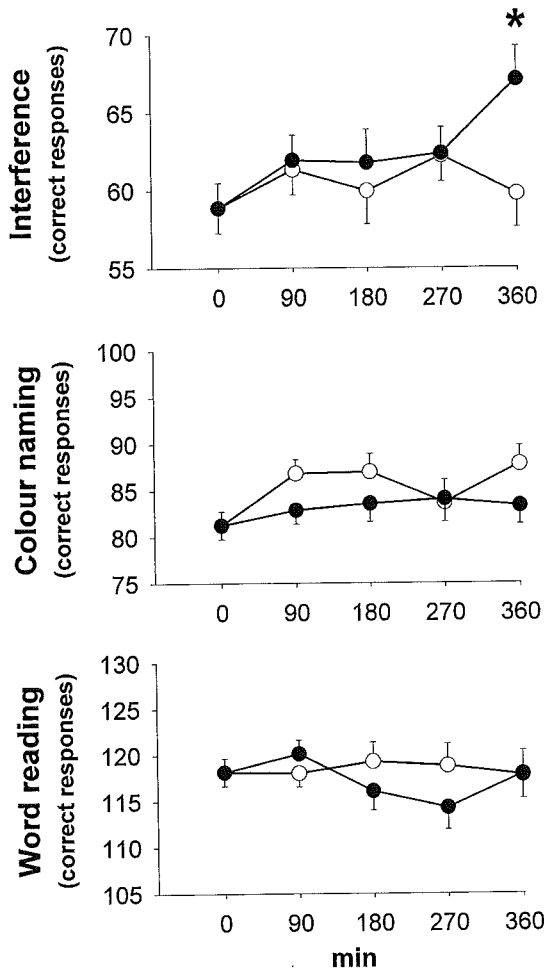


Abb. 6: Mittlere ($\pm$ SE) richtige Antworten im word reading, color naming und Interferenz Untertest des Stroop Tests. Der Test wurde durchgeführt unter Baselinebedingungen und alle 90 Minuten während konstanter Infusion von Insulin in einer Rate von $1.5 \text{ mE/kg} \times \text{min}$ (weiße Kreise) und $15 \text{ mE/kg} \times \text{min}$ (schwarze Kreise). Die Werte sind gemäß der Kovarianzanalyse baseline adjustiert. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede zwischen der hohen und niedrigen Insulinbedingung: * = $p < 0.05$. Die Ordinate zeigt die Anzahl der richtigen Antworten innerhalb von 45 Sekunden.

Subjektives Empfinden

Die Erfassung des subjektiven Befindens durch Rating Skalen im 15 Minuten Abstand zeigte, dass sich die Probanden unter hohen Seruminsulinspiegeln signifikant weniger unruhig ($p < 0.05$) und verärgert ($p < 0.04$) fühlten und weniger Konzentrationstörungen angaben ($p < 0.03$). Das subjektive wahrgenommene Schwitzen war entsprechend vor allem während der initialen Phase der Insulininfusion reduziert (Gruppe $\times$ Zeit: $p < 0.007$). Bei den Probanden, die nach einer zehnstündigen Fastenperiode morgens nüchtern ins Versuchslabor kamen, nahm das Hungergefühl unter niedrigen Seruminsulinspiegeln im Verlauf des sechsstündigen Experiments deutlich zu. Unter hohen Seruminsulinspiegeln war dagegen eine Zunahme des Hungergefühls erst mehr als vier Stunden später zu beobachten (Gruppe $\times$ Zeit: $p < 0.007$) (Abb. 7).

Am Ende des Experiments waren die Probanden nicht in der Lage korrekt anzugeben, ob sie Insulin in der hohen oder niedrigen Infusionsrate erhalten hatten.

Diskussion

Diese Ergebnisse zeigen, dass Insulin beim gesunden Menschen die kognitiven Funktionen verbessert. Sie basieren auf dem Vergleich neurophysiologischer und behavioraler Parameter von Aufmerksamkeit und Gedächtnis bei zwei Gruppen, bei denen hohe und niedrige Seruminsulinspiegel durch eine Insulininfusion erzeugt wurden, während die Blutglukosespiegel konstant gehalten wurden. Eine Placebogruppe wurde nicht eingeführt, um eine extrem lange Fastenperiode zu vermeiden, bei der bekanntlich die Blutzuckerspiegel abfallen und somit andere neuroendokrine Parameter wie Leptin oder Neuropeptid Y beeinflussen (29-32), die die Insulinwirkung verfälschen können. Eine Verhinderung eines Absinkens des Blutzuckers durch eine reine Glukoseinfusion während des Fastens stellt ebenfalls keine geeignete Kontrollbedingung dar, da es dadurch zu unkontrollierten Oszillationen der Seruminsulinspiegel kommt (33). Solche Veränderungen sind nicht zu erwarten während einer Art Sättigungszustand, wie er hier während des euglykämischen Clamps induziert wurde. Um deutliche Unterschiede zu erzeugen, wurden physiologische und supraphysiologische Insulinspiegel erzeugt. Da die Bioaktivität des Insulins bekanntlich einer sigmoidalen Kurve folgt (34,35), ist zu erwarten, dass diese Insulineffekte auch innerhalb des physiologischen Konzentrationsbereichs von Bedeutung sind.

Sensorische Reizverarbeitungsprozesse wurden anhand von AEPs während einer Aufmerksamkeitsaufgabe untersucht. Im Vergleich zu niedrigen Seruminsulinspiegeln nahm die P3 Latenz unter hohen Seruminsulinspiegeln bereits nach 90 Minuten Insulininfusion

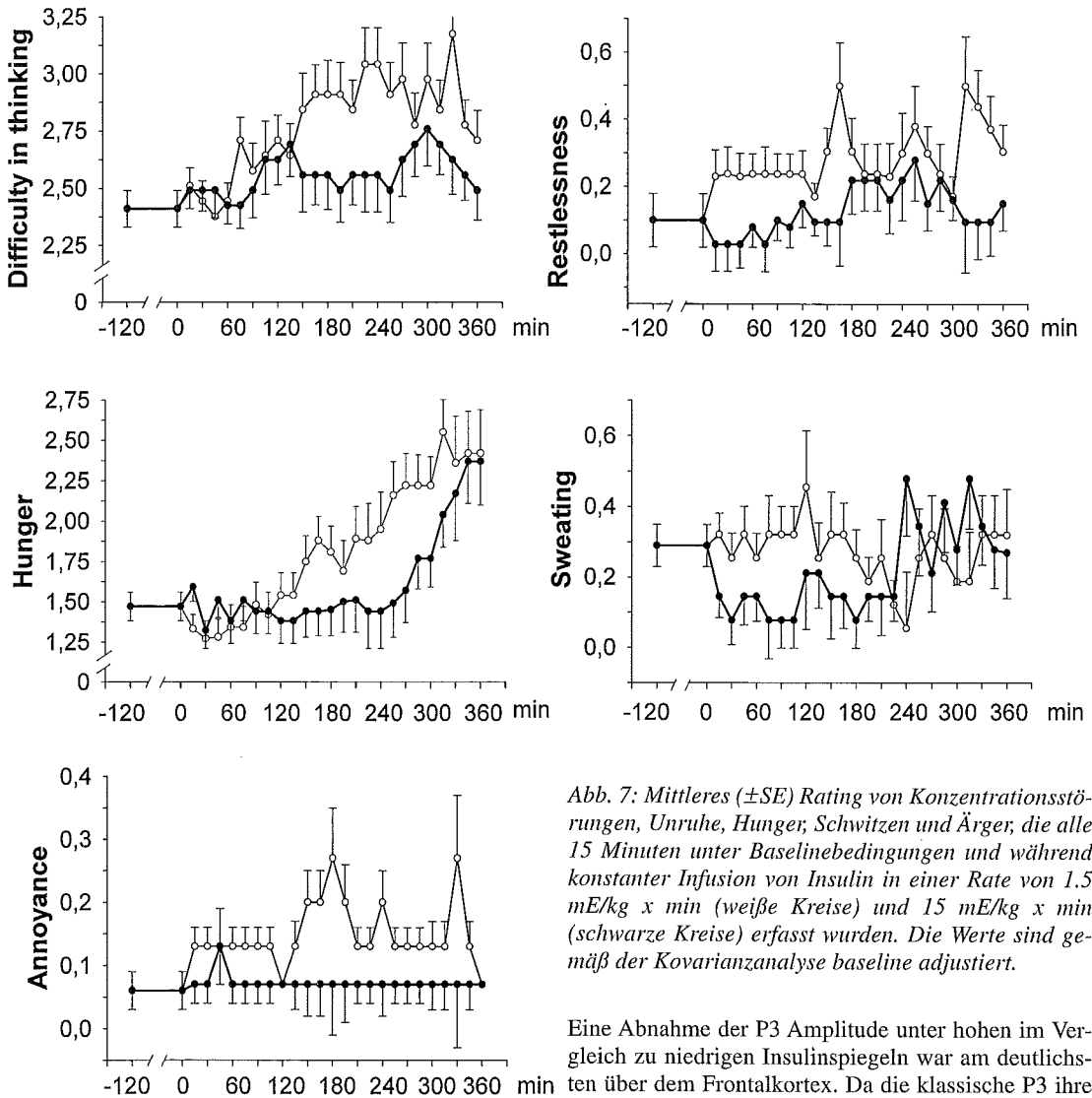


Abb. 7: Mittleres ($\pm$ SE) Rating von Konzentrationsstörungen, Unruhe, Hunger, Schwitzen und Ärger, die alle 15 Minuten unter Baselinebedingungen und während konstanter Infusion von Insulin in einer Rate von 1.5 mE/kg x min (weiße Kreise) und 15 mE/kg x min (schwarze Kreise) erfasst wurden. Die Werte sind gemäß der Kovarianzanalyse baseline adjustiert.

deutlich zu. Mit zunehmender Zeit, die in der Hyperinsulinämie verbracht wurde, nahm auch unter niedrigeren Seruminsulinspiegeln die P3 Latenz kontinuierlich zu und erreichte am Ende des Versuchs (nach 270 - 360 min. Insulininfusion) die gleichen Werte wie unter hohen Seruminsulinspiegeln (Abb. 2). Der Zeitverlauf dieser Veränderungen ist gut vereinbar mit einem rezeptorvermittelten Transportmechanismus für Insulin über die Blut-Hirn-Schranke (36,37), der einen langsamen Anstieg der Insulinkonzentration im Gehirn in der niedrigen Insulinbedingung erwarten lässt, der sich jedoch mit zunehmender Zeit der der hohen Insulinbedingung angleicht.

Eine Abnahme der P3 Amplitude unter hohen im Vergleich zu niedrigen Insulinspiegeln war am deutlichsten über dem Frontalkortex. Da die klassische P3 ihre größte Ausprägung über dem parietalen Kortex zeigt, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Potentialveränderungen von einer frontalen negativen slow wave verursacht sind (38). Tatsächlich war der negative Shift über dem Frontalkortex am deutlichsten 500-700 ms nach Reizvorgabe, einem Zeitintervall, das nach dem typischen Latenzintervall der P3 liegt. Eine vergleichbare negative slow wave über frontokortikalen Arealen wurde auch nach intranasaler Gabe von Insulin (27) und auch während Insulin induzierter Hypoglykämie bei gesunden Probanden (39) und Patienten mit Typ 2 Diabetes (40) beobachtet. Aus psychophysiologischen Untersuchungen ist bekannt, dass eine frontale negative slow wave eine vermehrte Bereitstellung von Energieressourcen widerspiegelt (38,41-46). Für eine vermehrte Bereitstellung von Verarbeitungskapazitäten

über eine Aktivierung von frontokortikalen Zellverbänden als Folge der erhöhten Insulinspiegel spricht auch die Korrelation zwischen frontokortikaler Negativität und der Erinnerungsleistung, wie sie in dieser und vorangegangenen Studien beobachtet wurde (44,47).

Die frontale negative slow wave wurde in Verbindung gebracht mit einem Dialog zwischen hippocampalen und frontokortikalen Strukturen bei der Regulation von Aufmerksamkeitsprozessen (48-53). In Anbetracht der hohen Dichte von Insulinrezeptoren in verschiedenen Zellschichten des Hippocampus (2,3) ist es gut vorstellbar, dass der frontale negative Potentialshift unter hohen Seruminsulinspiegeln durch Veränderungen der neuronalen Aktivität im Hippocampus verursacht wird. In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass Insulin dosisabhängig die hippocampale Entladungsrate beeinflusst (6). Zudem steigerte intracerebroventrikuläre Gabe von Insulin die hippocampale Glukoseutilisation (14), während eine Zerstörung der Insulinrezeptoren im Gehirn mit Streptozotocin die hippocampale Glukoseutilisation beeinträchtigte (12,13). Eine Erhöhung der Seruminsulinspiegel unter euglykämischen Bedingungen erhöhte zudem die Insulinbindung in der hippocampalen CA 1 Region (54).

Zusätzliche Hinweise für eine Wirkung des Insulins auf die Aktivität des Hippocampus ist von der Verbesserung des Gedächtnisses abzuleiten, die mit der Entstehung einer frontalen negativen slow wave einherging. Der Hippocampus in Verbindung mit dem angrenzenden medialen Temporalkortex spielt eine wichtige Rolle bei der bewussten Akquisition und Erinnerung von neuen Informationen, einem Prozess der als deklaratives Gedächtnis bezeichnet wird (55). Erste Hinweise für einen Einfluss des Insulins auf die Gedächtnisleistung stammen von Untersuchungen bei Ratten, die passives Vermeidungsverhalten unter gemeinsamer Gabe von Insulin und Glukose besser erlernten (56). Demgegenüber zeigte sich eine Verschlechterung der Akquisition und Konsolidierung von Gedächtnisinhalten, wenn die Insulinrezeptoren im Gehirn durch Streptozotocin zerstört wurden (57-59). Entsprechend führte eine Reduktion der Seruminsulinspiegel bei Mäusen mit einem Streptozotocin induziertem Diabetes zu einem deutlichen Gedächtnisdefizit in einer Aufgabe zum aktiven Vermeidungsverhalten, das durch eine einzige Injektion von Insulin reversibel war (60). Diese Effekte könnten durch eine vermehrte Glukoseutilisation (12-14) oder eine Aktivierung der cholinergen Neurotransmission vermittelt sein (61-64).

Eine alternative Möglichkeit wäre, dass der Gedächtnisverbessernde Effekt des Insulins durch eine Steigerung der selektiven Aufmerksamkeit vermittelt ist, wodurch die Enkodierung relevanter Informationen erleichtert wird. Insulin moduliert die Aufnahme von Noradrena-

lin in den Hippocampus (65) und die hippocampale Sensitivität für Noradrenalin spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der selektiven Aufmerksamkeit im Tierversuch (66). Diese Sichtweise steht in guter Übereinstimmung mit der beobachteten verbesserten Leistung im Stroop Interferenz Test unter hohen im Vergleich zu niedrigen Seruminsulinspiegeln. Der Stroop Interferenz Test gilt als Maß für die selektive Aufmerksamkeit, in die entscheidend Funktionen des Frontalkortex involviert sind (67,68). Die verbesserte Leistung im Stroop Test unterstützt weiter die Annahme eines regulatorischen Einflusses des Insulins auf hippocampalfrontokortikale Interaktion, die in erster Linie dazu dienen könnten, die Bereitstellung von Aufmerksamkeitskapazitäten für Reize zu erleichtern, die im Arbeitsgedächtnis gespeichert werden sollen (69,70). Dieser Effekt könnte mit dem subjektiven Empfinden von weniger Konzentrationsstörungen assoziiert sein, wie er von den Probanden unter hohen Seruminsulinspiegeln berichtet wurde.

Diese Ergebnisse sind von entscheidender klinischer Bedeutung für Patienten mit veränderten Insulinkonzentrationen im zentralen Nervensystem wie Patienten mit M. Alzheimer oder Diabetes mellitus, bei denen die Seruminsulinspiegel häufig supraphysiologisch erhöht sind. Über die Bedeutung zentral nervöser Insulineffekte bei diesen Patienten liegen jedoch bislang keine Untersuchungen vor. Durch die kürzlich gemachte Beobachtung, dass die intranasale Gabe von Insulin selektiv die Insulinkonzentration im Liquor erhöht (71) und die gleichen Veränderungen evozierter Potentiale bewirkt wie die intravenöse Insulingabe (27), besteht nun eine einfache, nicht invasive Methode, sich die verbessernden Effekte des Insulins auf Gedächtnis- und Aufmerksamkeitsprozesse therapeutisch nutzbar zu machen.

Literatur

1. Unger JW, Livingston JN, Moss AM (1991) Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects. *Prog Neurobiol* 36:343-362
2. Baskin DG, Figlewicz DP, Woods SC, Porte JrD, Dorsa DM (1987) Insulin in the brain. *Annu Rev Psychol* 49:334-347
3. Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte JrD (1992) Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocrine Reviews* 13:387-413
4. Poduslo JF, Curran GL, Berg CT (1997) Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain-barriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5705-5709
5. Kessler JA, Spray DC, Saez JC, Bennett MVL (1984) Determination of synaptic phenotype: Insulin and cAMP independently initiate development of electrotonic coupling between cultured sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6235-6239
6. Palovcik RA, Philipps MI, Kappy MS, Raizada MK (1984) Insulin inhibits pyramidal neurons in hippocampal slices. *Brain Res* 309:187-191

7. Shibata S, Liou SY, Ueki S, Oomura Y (1985) Inhibitory action of insulin on suprachiasmatic nucleus neurons in rat hypothalamic slice preparation. *Physiol Behav* 36:79-81
8. Sakaguchi T, Bray GA (1987) Intrahypothalamic injection of insulin decreases firing rate of sympathetic nerves. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2012-2014
9. Masters BA, Shemer J, Judkins JH, Clarke DW, LeRoith D, Raizada MK (1987) Insulin receptors and insulin action in dissociated brain cells. *Brain Res* 417:247-256
10. Peinado JM, Meyers RD (1991) Norepinephrine release from PVN and lateral hypothalamus during perfusion with 2-DG or insulin in the sated and fasted rat. *Pharmacol Biochem Behav* 27:715-721
11. Figlewicz DP, Szot P (1991) Insulin stimulates membrane phospholipid metabolism by enhancing endogenous alpha-adrenergic activity in the rat hippocampus. *Brain Res* 550:101-107
12. Duelli R, Schrock H, Kuschinsky W, Hoyer S (1994) Intracerebroventricular injection of streptozotocin induces discrete local changes in cerebral glucose utilization in rats. *Int J Dev Neurosci* 12:737-743
13. Plaschke K, Hoyer S (1993) Action of the diabetogenic drug streptozotocin on glycolytic metabolism in adult brain and hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 11:477-483
14. Henneberg N, Hoyer S (1994) Short-term or long-term intracerebroventricular (i.c.v.) infusion of insulin exhibits a discrete anabolic effect on cerebral energy metabolism in the rat. *Neurosci Lett* 175:153-156
15. Craft S, Peskind E, Schwartz MW, Schellenberg GD, Raskind M, Porte JrD (1998) Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease. *Neurology* 50:164-168
16. McCall AL (1992) The impact of diabetes on the CNS. *Diabetes* 41:557-570
17. Strachan MWJ, Deary J, Ewing FME, Frier BM (1997) Is type II diabetes associated with an increased risk of cognitive dysfunction? *Diabetes Care* 20:438-445
18. Pozzessere G, Valle E, De Crignis S, Cordischi VM, Fattapposta F, Rizzo PA, Pietravalle P, Cristina G, Morano S, Di Mario U (1991) Abnormalities of cognitive functions in IDDM revealed by P300 event-related potential analysis. *Diabetes* 40:952-958
19. Kurita A, Katayama K, Mochio S (1996) Neurophysiological evidence for altered higher brain functions in NIDDM. *Diabetes Care* 19:361-364
20. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group.: Hypoglycemia in the Diabetes Control and Complication Trial. *Diabetes* 46:271-286, 1997
21. Wickelgren I (1998) Tracking insulin to the mind. *Science* 280:517-519
22. Wallace WC, Akar CA, Lyons WE, Kole HK, Egan JM, Wolozin B (1997) Amyloid precursor protein requires the insulin signaling pathway for neurotrophic activity. *Brain Res Mol Brain Res* 52:213-227
23. Izumi Y, Pinard E, Roussel S, Seylaz J (1992) Insulin protects brain tissue against focal ischemia in rats. *Neurosci Lett* 144:121-123
24. Voll CL, Whishaw IQ, Auer RN (1989) Postischemic insulin reduces spatial learning deficit following transient forebrain ischemia in rats. *Stroke* 20:646-651
25. Näätänen R, Picton TW (1987) The N1 wave of the human electric and magnetic response to sound: a review and an analysis of the component structure. *Psychophysiology* 24:375-425
26. Donchin E (1981) Surprise ... surprise? *Psychophysiology* 18:493-513
27. Kern W, Born J, Schreiber H, Fehm HL (1999) Central nervous system effects of intranasally administered insulin during euglycemia in humans. *Diabetes* 48:557-563
28. Golden C (1978) Stroop color and word test. Chicago, Stoelting
29. Bergendahl M, Vance ML, Iranmanesh A, Thorner MO, Veldhuis JD (1996) Fasting as a metabolic stress paradigm selectively amplifies cortisol secretory burst mass and delays the time of maximal nyctohemeral cortisol concentrations in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 81:692-699
30. Sakaguchi T, Arase K, Fislis JS, Bray GA (1988) Effect of starvation and food intake on sympathetic activity. *Am J Physiol* 255:R284-R288
31. Schwartz MW, Seeley RJ (1997) Neuroendocrine responses to starvation and weight loss. *N Engl J Med* 336:1802-1811
32. Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, Marco C, Opentanova I, Nyce MR, Myint M, Caro JF (1996) Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes* 45:1511-1515
33. Kern W, Offenheuser S, Born J, Fehm HL (1996) Entrainment of ultradian oscillations in the secretion of insulin and glucagon to the NonREM/REM sleep rhythm in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1541-1547
34. Baron AD (1994) Hemodynamic actions of insulin. *Am J Physiol* 267:E187-E202
35. Kolterman OG, Insel J, Saekow M, Olefsky JM (1980) Mechanisms of insulin resistance in human obesity. *J Clin Invest* 65:1272-1284
36. Schwartz MW, Sipols AJ, Kahn SE, Lattemann DP, Taborsky JrG, Bergman RN, Woods SC, Porte JrD (1990) Kinetics and specificity of insulin uptake from plasma into cerebrospinal fluid. *Am J Physiol* 259:E378-E383
37. Baura GD, Foster DM, Porte JrD, Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, Schwartz MW (1993) Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. *J Clin Invest* 92:1824-1830
38. Rockstroh B, Elbert T, Canavan AGMT, Lutzenberger W, Birbaumer N (1989) Slow cortical potentials. München, Urban and Schwarzenberg
39. Smid HGOM, Trümper BG, Pottag G, Wagner K, Lobmann R, Scheich H, Lehnert H, Heinze H-J (1997) Differentiation of hypoglycemia induced cognitive impairments. *Brain* 120:1041-1056
40. Lobmann R, Smid H, Pottag G, Wagner K, Heinze HJ, Lehnert H (1998) Changes in information processing during a hypoglycemic clamp in type-II-diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 106:S63
41. Ruchkin DS, Johnson R Jr., Mahaffey D, Sutton S (1988) Towards a functional categorization of slow waves. *Psychophysiology* 25:339-353
42. Birbaumer N, Roberts LE, Lutzenberger W, Rockstroh B, Elbert T (1992) Area-specific self-regulation of slow cortical potentials on the sagittal midline and its effects on behaviour. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 84:353-361

43. Karis D, Fabiani M, Donchin E (1984) „P300“ and memory: individual differences in the von Restorff effect. *Cognitive Psychology* 16:177-216
44. Pelosi L, Hayward M, Blumhardt LD (1998) Which event-related potentials reflect memory processing in a digit-probe identification task? *Cognitive Brain Research* 6:205-218
45. Mecklinger A, Kramer AF, Strayer DL (1992) Event related potentials and EEG components in a semantic memory search task. *Psychophysiology* 29: 104-119
46. Pelosi L, Holly M, Slade T, Hayward M, Barrett G, Blumhardt LD (1992) Wave form variations in auditory event-related potentials evoked by a memory-scanning task and their relationship with tests of intellectual function. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 84:344-352
47. Lang W, Lang M, Podreka I, Steiner M, Uhl F, Suess E, Müller Ch, Deecke L (1988) DC-potential shifts and regional blood flow reveal frontal cortex involvement in human visuomotor learning. *Exp Brain Res* 71:353-364
48. Gerbrandt LK, Lawrence JC, Eckardt MJ, Lloyd RL (1978) Origin of the neocortically monitored theta rhythm in the curarized rat. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 45:454-467
49. Shinba T, Andow Y, Shinozaki T, Ozawa N, Yamamoto K (1996) Event-related potentials in the dorsal hippocampus of rats during an auditory discrimination task. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 100:563-568
50. Halgren E, Squires NK, Wilson CL, Rohrbaugh JW, Babb TL, Crandall PH (1980) Endogenous potentials generated in the hippocampal formation and amygdala by infrequent events. *Science* 210:803-805
51. Okada YC, Kaufman L, Williamson SJ (1983) The hippocampal formation as a source of the slow endogenous potentials. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 55:417-426
52. Caudle RM (1993) The demonstration of long latency potentials in the CA1 region of the rat hippocampal slice. *Brain Res* 613:247-250
53. Tarkka IM, Stokic DS, Basile LF, Papnicolaou AC (1995) Electric source localization of the auditory P300 agrees with magnetic source localization. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 96:538-545
54. Marfaing P, Penicaud L, Broer Y, Mraovitch S, Calando Y, Picon L (1990) Effect of hyperinsulinemia on local cerebral insulin binding and glucose utilization in normoglycemic awake rats. *Neurosci Lett* 115:279
55. Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis of findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99:195
56. Messier C, White NM (1987) Memory improvement by glucose, fructose, and two glucose analogs: a possible effect on peripheral glucose transport. *Behav Neural Biol* 48:104-127
57. Long JM, Davis BJ, Garofalo P, Spangler EL, Ingram DK (1992) Complex maze performance in young and aged rats: response to glucose treatment and relationship to blood insulin and glucose. *Physiol Behav* 51:411-418
58. Mayer G, Nitsch R, Hoyer S (1990) Effects of changes in peripheral and cerebral glucose metabolism on locomotor activity, learning and memory in adult male rats. *Brain Res* 532:95-100
59. Santucci AC, Schroeder H, Riccio DC (1990) Homeostatic disruption and memory: effect of insulin administration in rats. *Behav Neural Biol* 53:321-333
60. Flood JF, Mooradian AD, Morley JE (1990) Characteristics of learning and memory in streptozocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 39:1391-1398
61. Shiosaka S (1992) Attempts to make models for Alzheimer's disease. *Neurosci Res* 13:237
62. Durkin TP, Messier C, De Boer P, Westerink BHC (1992) Raised glucose levels enhance scopolamine-induced acetylcholine overflow from the hippocampus: an in vivo microdialysis study in the rat. *Behav Brain Res* 49:181
63. Stone WS, Cottrill KL, Walker DL, Gold PE (1988) Blood glucose and brain function: interactions with CNS cholinergic systems. *Behav Neural Biol* 50:325
64. Messier C, Destrade C (1994) Insulin attenuates scopolamine-induced memory deficits. *Psychobiology* 22:16-21
65. Boyd FT, Clarke DW, Muther TF, Raizada MK (1985) Insulin receptors and insulin modulation of norepinephrine uptake in neuronal cultures from rat brain. *JBiol Chem* 260:15880-15884
66. McEwen B (1988) Glucocorticoid receptors in the brain. *Hospital Practice* 23:107-121
67. Lezak MD (1993) Neuropsychological assessment. New York, Oxford University Press
68. Taylor SF, Kornblum S, Lauber EJ, Minoshima S, Koeppe RA (1997) Isolation of specific interference processing in the stroop task: PET activation studies. *Neuroimage* 6:81-92
69. Okita T, Wijers AA, Mulder G, Mulder LJM (1985) Memory search and visual spatial attention: an event related brain potential analysis. *Acta Psychol* 60:263-292
70. Näätänen R (1982) Processing negativity: an evoked-potential reflection of selective attention. *Psychol Bull* 92:605-640
71. Kern W, Born J, Klotz KF, Fehm HL (1999) Intranasale Insulingabe erhöht selektiv die Insulinkonzentration im Liquor beim Menschen. *Diab Stoffw* 8:46

Kraft, Ausdauer und Erfindungsgeist

H. Arnold*

Herr Bürgermeister, Spectabilitäten, sehr verehrte Kolleginnen und Kollegen, liebe Kommilitoninnen und Kommilitonen, liebe Mitwirkende im Chor und Orchester, meine sehr verehrten Damen und Herren,

wir versammeln uns an dieser Stätte der Begegnung, um Sie, die Ihr Studium an der Lübecker Universität beginnen, zu begrüßen. Erstmals dient dieser feierliche, dem Anlass angemessene historische Raum dazu. Dem Kuratorium St. Petri mit Herrn Pastor Harig dankt die Universität dafür, dass diese Feierstunde hier stattfinden kann. Der Wunsch der Universität, Ihre Immatrikulation hier zu begehen, hat mehrere Gründe. Erstens sprengt der Ansturm der Studienbewerber erstmalig die Größe auch des größten Hörsaales der Universität. Zweitens möchten die Universität und die Stadt Lübeck mit der Verlegung dieser Feier in die Altstadt öffentlich betonen, dass sie fest zusammenstehen und ihr Wohl und Wehe ihr gemeinsames Interesse ist. Drittens bereitet die alte Hansestadt Lübeck der jungen Universität den geschichtsträchtigen Boden, um hier zu wurzeln.

Die Neigung der Lübecker Bürger zu Naturwissenschaften und Medizin wurde bereits 1895 in den Lübeck'schen Anzeigen formuliert. Damals empfing die Stadt die „Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte“ festlich mit Fahnen. Man schrieb: „Bei der höchsten Achtung vor den gelehrten Ständen der Juristen, der Theologen, der Philosophen, der Alt- und Neuphilologen und anderer stehen uns doch Naturforscher und Ärzte menschlich näher.“ Die Universität kommt dieser Neigung entgegen. Wir begrüßen heute 186 Studierende der Medizin, 117 Studierende der Informatik und 206 Studierende der Biotechnologie. Wir nehmen sie auf in die Gemeinschaft der Universität, die das Land Schleswig-Holstein mit der Entwicklung eines Innovations-Campus und dem Bau eines Hochschulstadteiles – beides sind imposante Projekte – weiter zu fördern gedenkt. Der Spatenstich für das erste Gebäude auf dem Innovations-Campus ist kürzlich erfolgt.

Liebe Studierende, Sie haben eine kleine Universität gewählt. Sie bietet Ihnen den Vorteil, sehr persönlichen Kontakt zu Ihren Lehrern halten zu können; dagegen steht der Nachteil, dass die Geisteswissenschaften fast nicht vertreten sind. Dieser Nachteil wird durch das sehr aktive Institut für Medizin- und Wissenschaftsgeschichte unter Herrn Prof. von Engelhardt z. T. kompensiert. Er organisiert auch das „Studium Generale“. Ein zusätzliches Angebot ist die von der Universitätsstiftung getragene Gastprofessur im Wintersemester, zu der wir in diesem Jahr den Staatsrechtler Herrn Prof. von Arnim aus Speyer erwarten. Seine z. T. brisanten aktuellen Beiträge empfehle ich nicht nur den Hörern aller Fakultäten, sondern auch den Bürgern dieser Stadt, Vertretern der Parteien und Juristen.

Sie kommen in eine Stadt, die vom Handel geprägt wurde, inzwischen aber auch als Universitäts- und schon lange als Kulturstadt einen Namen hat. Auch die Universität leistet ihren Beitrag zur Kultur. Wir freuen uns, wenn die Musikalischen unter Ihnen sich im Orchester oder Chor der Medizinischen Universität engagieren.

Der Strukturwandel der Universität trägt mit den Studiengängen Informatik und Biotechnologie dem soziostrukturellen Wandel zur Informationsgesellschaft und den großen, im einzelnen noch nicht abschätzbaren Chancen Rechnung, die die Genomforschung, die Forschung an komplexen Eiweißkörpern und die Entwicklung von Techniken, welche molekulare und atomare Strukturen sichtbar machen, bieten. Mit diesem Semester startet der Studiengang Biotechnologie.

Medizin, Informatik und Biotechnologie unterstützen sich gegenseitig. Industrie, Gesundheitswesen und Bildungswesen bedürfen dringend gut ausgebildeter Diplom-informatikerinnen und Diplom-informatiker. Datenaquisition, Qualitätsmanagement und Logistik, künstliche Intelligenz und Simulation, virtuelle Welten, medizinische und biotechnologische Forschung und Technik schreien förmlich nach Informatikspezialisten. Die Universität ist ohne hochkarätige Informatik nicht mehr vorstellbar. Mit der Entwicklung von Bachelor- und Masterstudiengängen haben die Lübecker Informatik-Lehrstuhlinhaber ihr Lehrangebot an internationale Anforderungen adaptiert. Sie, künftige Informatiker, werden dringend gebraucht.

* Begrüßungsansprache des Rektors der Medizinischen Universität zu Lübeck, Prof. Dr. med. Hans Arnold, zur Semestereröffnung am 15. Oktober 2001 in St. Petri zu Lübeck.

Deshalb dürfen die Einsparungen, zu denen sich die öffentliche Hand genötigt sieht, nicht auch die Entwicklung Ihres Studienganges behindern.

Die Studierenden der Medizin werden nicht nur sehr gute Kenntnisse in der heutigen Wissenschaftssprache Englisch, sondern auch in der Informatik benötigen. Im Gegensatz zu den letzten Jahren, in denen wir meinten, Medizinstudierenden noch düstere Prognosen stellen zu müssen, zeichnet sich jetzt ab, dass Sie neben der Medizin auch in anderen Berufsfeldern sehr gute Chancen haben. Mit uns müssen Sie Acht geben, dass die Neuordnung des Gesundheitswesens, die aus ökonomischen Gründen notwendig ist, nicht das Primat der Ökonomie über das ethisch-soziale Ziel praktischer Medizin setzt. Bitte helfen Sie mit, in Deutschland die Balance herzustellen zwischen dem, was in der medizinischen Betreuung der Bevölkerung humane Pflicht und ethische Verpflichtung ist, und dem, was Politik und Gesellschaft an sparsamem Umgang mit den verfügbaren Ressourcen fordern.

Diesem Ziel wird auch die Biotechnologie sowohl in der Grundlagen- als auch in der angewandten Forschung dienen. Mit ihrer Hilfe wird es gelingen, pharmakologische Wirksubstanzen rascher aufzuspüren und zu synthetisieren, die Wirkungen von Anteilen des Genoms und von Proteinen zu bestimmen und für Behandlung und Vorbeugung von Krankheiten zu nutzen. Die Ergebnisse des wissenschaftlich-technischen Fortschrittes machen die Welt immer reicher an Fragen, die wiederum mit wachsender Geschwindigkeit und in zunehmender Kleinteiligkeit gelöst werden, welche Arbeitsteilung voraussetzt und erzwingt. Niemand von uns erzeugt ja etwas allein aus sich selbst heraus, nicht einmal die eigene Persönlichkeit noch eines ihrer Produkte, alles verdankt sich den Wirkungen von Gruppen. So schnell, wie die Menschheit sich Wissen erschließt, kann die Leistung des einzelnen menschlichen Hirnes nicht wachsen. Diesem Missstand abzuhelpen, wird menschliche Hirnleistung in vielen Arealen substituiert. Gedächtnis auf der Festplatte, Motorik vom Kickboard bis zur interplanetaren Raumfähre, Kommunikation vom Briefpapier bis zur E-Mail, zu allen Print- und visuellen Medien und zum Handy, Mathematik vom Schulbuch bis zum Groß- und Hochleistungsrechner, Sehen vom Kernspinspektroskop für die molekulare bis zum Hubble-Observatorium für die interstellare Dimension. Die heutige Wissenschaft begreift sowohl die Geschichte der Menschheit als auch die Entwicklung des Lebens auf dem Planeten Erde ebenso wie das Entstehen und Vergehen von Sonnensystemen als Prozesse, die durch Forschung Detail für Detail verstehbar sind und entschlüsselt werden können. Die das 19. Jahrhundert kennzeichnende Überzeugung, dass die Wissenschaft unaufhaltsam und zwangsläufig fortschreite, weil die Forschung die hin-

ter jeder Antwort neu aufscheinenden Fragen beantworten werde, hat mit dem Informatik-gestützten, noch in Beschleunigung begriffenen Wissenszuwachs der letzten Jahrzehnte neue Nahrung erhalten. Das 20. Jahrhundert hat jedoch einprägsam gelehrt, dass Forschungsergebnisse an sich weder gut noch böse sind; je nach Verwendung und Potential vermögen sie nie gekannten Wohlstand oder unsägliches Elend zu stiften.

Die verabscheuungswürdigen Ereignisse des 11. September 2001 haben neben Angst, Verunsicherung und internationaler Solidarität in der Bekämpfung des Terrorismus auch zum Nachdenken über die Hintergründe angeregt. Sicher nicht die einzige, aber eine besonders nachhaltige Ursache des Terrorismus dürfte die beschämende und für die Benachteiligten unerträgliche Ungleichverteilung der Chancen auf Bildung und langes Leben in Gesundheit und Wohlstand sowie wirtschaftlicher und militärischer Macht sein. Liebe Studierende, Ihre Ausbildung wird Sie befähigen, als Helfer und einsichtsvolle Vermittler an einem allmählichen Ausgleich mitzuwirken, sowohl im eigenen Land als auch international.

Hierzulande wird man kaum noch etwas finden, was man als originäre Natur bezeichnen kann. Menschliche Einwirkung hat alles verändert oder beeinflusst und fährt darin fort. Selbst die menschliche Evolution führen heute wissenschaftliche und technische menschliche Köpfe und Hände weiter. Mit dieser Einflussnahme wächst aber auch die Verantwortung jedes Einzelnen für denkbare unwillkommene Auswirkungen der Forschung und des anonymen technischen Wandels.

Allen Hochschulabsolventen erwachsen in der von Wissenschaft und Technik geformten Welt kommunikative Pflichten gegenüber der Gesellschaft. Diese setzen die Beherrschung zahlreicher Schlüsselqualifikationen voraus. Diese jugendlichen Eigenschaften bringen Sie alle mit: Flexibilität, Autonomie im Lernen, Schablonen meidendes zweifelvolles problemzentriertes Denken, Fähigkeit zur Arbeit in der Gruppe und Bereitschaft zum Gespräch. Es gibt außerdem einen sehr materiellen Anlass, der Sie und uns der Bevölkerung verpflichtet: Der Staat schenkt Ihnen das Studium, dessen Kosten mit 350 bis 400 Tausend Mark für einen Mediziner oder einen Naturwissenschaftler wahrscheinlich noch zu niedrig veranschlagt sind; der Steuerzahler darf also verlangen zu verstehen, was Studium, Forschung und Wissenschaft bedeuten und bewirken.

Einige von Ihnen werden bisher nur schwer oder nicht heilbare Krankheiten erfolgreich bekämpfen, andere werden ihren Beitrag leisten, um im Hochtechnologiebereich einen für die Allgemeinheit verfügbaren Mehrwert zu schaffen. Die demokratische Verfassung dieses Landes soll dafür sorgen, dass dieser Mehrwert gerecht verteilt wird. Das geschieht nicht von selbst. Schon

Madison, Freund und Konkurrent von Thomas Jefferson und Mitautor der amerikanischen Verfassung, hat darauf hingewiesen, dass auch der demokratische Staat nicht ohne Oligarchien auskommt. Diese notwendigen Oligarchien zu kontrollieren ist unser aller Aufgabe. Das Interesse allerdings, am demokratischen Kontrollprozess teilzunehmen, ist sehr gesunken. Wohlstand, Unübersichtlichkeit und Unsichtbarkeit der Herrschaftsprozesse, Oligarchiebedingter Demokratieverlust, Verlagerung der Entscheidungen aus dem Plenum des Parlamentes in die Ausschüsse, Abhängigkeit der Politik von den Konzernen und von den Medien haben weithin Resignation erzeugt. Hinzu kommt, dass in unseren Parlamenten die Mehrheiten von der Menge der Uninformierten gebildet werden, die sich in Treu und Glauben auf die Aussagen der informierten Minderheit, z. B. der jeweiligen Mitglieder eines parlamentarischen Ausschusses, verlassen müssen und verlassen. Wer nie unter einer Diktatur lebte, schätzt die Demokratie möglicherweise wegen der genannten Schattenseiten gering und fühlt sich darin durch das derzeitige Umsteuern des Staates vom Ziel des Gemeinwohles auf das des ökonomischen Erfolges bestärkt.

Aber wir haben alle nichts besseres, als uns in der Gemeinschaft der Wähler mit unserer Stimme oder außerparlamentarisch mit Korrektur, Kritik oder Zustimmung zu Wort zu melden. Kant schrieb: „Es ist die Öffentlichkeit, die die Übereinstimmung der Politik mit der Moral herbeiführt“. Die Öffentlichkeit sind wir alle.

Sie erwerben mit der Immatrikulation demokratische Rechte und Pflichten. Ich gestehe zu, dass Demokratie an der Universität Demokratie im Kleinen ist. Doch ist

sie hier genau so nötig und sinnvoll wie im Großen und insofern für Sie auch eine Art Übungsfeld. Deshalb sehe ich mit Enttäuschung und Unverständnis auf die regelmäßig geringe Beteiligung bei der Wahl des Allgemeinen Studentenausschusses. Mit etwa 25 % nimmt Lübeck im Bundesvergleich trotzdem schon eine Spitzenstellung ein. Damit legitimiert eine Minderheit die gewählte Gruppe zur Vertretung der studentischen Interessen. Das ist eher Lethargie als Demokratie. Ihre Möglichkeiten im Rahmen der universitären Selbstverwaltung sind nicht so gering, dass Sie sie einfach ignorieren sollten: Umstrukturierung des Studiums, Einfluss auf Lehrinhalte, Mitwirkung bei den Zukunftsentscheidungen der Universität. Ihr solidarisches Auftreten kann Stadt- und Landespolitik bewegen!

Richten Sie sich darauf ein, dass Sie mit Ihrem Studium nicht das Studieren beenden können. Sie werden lebenslang studieren müssen. Einige wenige haben das allerdings missverstanden; sie meinen, sie müssten lebenslang an der Universität studieren. Hier sollten Sie lernen, lebenslanges Studium neben und im Beruf zu organisieren. Bitte gehen Sie von vornherein ohne Scheu und übertriebene Zurückhaltung auf uns, auf Ihre Hochschullehrer zu, geben Sie uns Gelegenheit Sie zu fördern. Für diese Förderung können auch die internationalen Beziehungen dieser Universität genutzt werden.

Wir freuen uns auf Sie und möchten Sie in jeder Weise unterstützen. Zusammen mit meinen Kolleginnen und Kollegen wünsche ich Ihnen Glück, Kraft, Ausdauer und Erfindungsgeist. Seien Sie uns herzlich willkommen!

Personalia

Verstorben

Prof. Dr. med. Klaus K r u s e, Direktor der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Lübeck, ist verstorben. Eine Würdigung der Person und ihres Wirkens veröffentlicht Focus MUL in der nächsten Ausgabe.

Professuren

Priv.-Doz. Dr. med. Olaf H i o r t, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Lübeck, hat den Ruf auf eine C 3-Professur für Kinderheilkunde an der Medizinischen Fakultät Lübeck angenommen. Er wird den Bereich Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin leiten. Gleichzeitig ist er zum Sprecher einer neu von der Deutschen Forschungsgemeinschaft eingerichteten kli-

nischen Forschergruppe zum Thema „Intersexualität – vom Gen zur Geschlechtsidentität“ ernannt worden.

Priv.-Doz. Dr. phil. nat. Roland H. W e n g e r, Hochschuldozent am Universitätsinstitut für Physiologie Lübeck, hat einen Ruf auf eine C3-Professur für Physiologie an der Universität Leipzig angenommen.

Sachverständigenkommissionen

Prof. Dr. phil. Dietrich v o n E n g e l h a r d t, Universitätsinstitut für Medizin und Wissenschaftsgeschichte Lübeck, wurde von der Landesregierung in Südtirol zum stellvertretenden Vorsitzenden der neugegründeten Landesethikkommission gewählt. Die Kommission ist neben den Ethikkomitees für den Sanitätsbereich für folgende Fragen zuständig: Erprobung neuer diagnostischer und therapeutischer Methoden am Menschen; Genetik, künstliche Befruchtung und perinatale Medizin, Transplantation von menschlichen Organen und

Gewebe, Schutz der Lebensqualität und der Würde des Kranken mit besonderer Berücksichtigung der Patienten im terminalen Stadium, der Minderjährigen und der Behinderten; Schmerztherapie; jede andere diagnostische und therapeutische Tätigkeit, die ethische Fragen aufwirft; allgemeine Richtlinien im Bereich der klinischen Versuche; Beurteilung klinischer Versuche; Vorschläge für die Aufklärungs- und Bildungsarbeit über ethische Fragen, die mit der ärztlichen Betreuung zusammenhängen.

Prof. Dr. med. Wolfgang J e l k m a n n, Universitätsinstitut für Physiologie Lübeck, wurde vom Bundesministerium des Innern in den Fachbeirat „Medizin, Dopinganalytik, Behindertensport“ zur Beratung des Bundesinstituts für Sportwissenschaft berufen.

Preise

Hans Jörg H a m m e r s, Doktorand der Humanmedizin in der Arbeitsgruppe von Dr. med. Peter S c h l e n k e am Universitätsinstitut für Immunologie und Transfusionsmedizin Lübeck, erhielt für seine experimentelle Promotionsarbeit den Klaus-Goertler-Preis der Deutschen Gesellschaft für Zytometrie. Im Mittelpunkt der Arbeit „Ultraviolet-induced detection of halogenated pyrimidines: simultaneous analysis of DNA replication and cellular markers“ stand die Entwicklung einer neuen durchflusszytometrischen Methode, die den simultanen Nachweis von Zellzyklusphasen und zellulären Antigenen erlaubt. Die neue Technologie wurde in der Zeitschrift *Cytometry* 2000, 40:327-335, sowie als Buchkapitel in „Current Protocols in Cytometry“ (Unit 7.15) publiziert und ebenso als Patent am Europäischen Patentamt in München angemeldet.

Priv.-Doz. Dr. med. Werner K e r n, Medizinische Universitätsklinik I Lübeck, hat für seine Arbeit „Improving Influence of Insulin on Cognitive Functions in Humans“ den diesjährigen Ernst-und-Berta-Scharrer-Preis der Sektion Neuroendokrinologie der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie erhalten. Die erbrachten Befunde zeigen anhand neurophysiologischer, behavioraler und subjektiver Parameter, dass Insulin einen positiven Einfluss auf die kognitiven Funktionen beim Menschen ausübt. Dies könnte von klinischer Bedeutung für Patienten mit einem Diabetes mellitus sein, bei denen häufig Veränderungen der Seruminsulinspiegel zu beobachten sind, aber auch für Patienten mit M. Alzheimer, bei denen kürzlich eine verminderte Insulinkonzentration im Liquor nachgewiesen wurde.

Prof. Dr. med. Ursula S c h m i d t - E r f u r t h, Universitätsklinik für Augenheilkunde Lübeck, hat den Forschungspreis der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft erhalten. Es wurden damit ihre Entwicklungsarbeiten zur so genannten topographischen Angiographie gewürdigt, mit welcher es möglich ist, eine

räumliche Darstellung von Durchblutungscharakteristika der Netzhaut- und Aderhautgefäße zu geben.

Dimitri T c h e r k a s s o v, Student der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck, wurde zusammen mit Dr. rer. nat. Englbert B ä u m l, Dr. med. Christian H e n n i g, Dr. med. Norman K o c k und Prof. em. Dr. rer. nat. Walther T r a u t mit dem Hamburger Gründerpreis für die beste Geschäftsidee ausgezeichnet. Die Mediziner und Naturwissenschaftler der MUL erhielten den mit 10.000 Mark dotierten Preis für die Entwicklung eines speziellen Sequenzierverfahrens zur Genanalyse. Für die Realisierung und Verwertung des neuartigen Verfahrens gründeten sie die Firma GenoVoxx GbR.

Dr. rer. nat. Eva-Maria W o l b e r hat den Professor-Otto-Roth-Preis 2001 der Gesellschaft der Freunde und Förderer der Medizinischen Universität zu Lübeck erhalten. Der mit 5000 Mark dotierte Preis wurde ihr für ihre am Universitätsinstitut für Physiologie Lübeck geschriebene Dissertation „Steuerung der menschlichen Thrombopoietin-Genexpression“ verliehen. Die Untersuchungen von Frau Dr. Wolber haben wichtige Aufschlüsse über die Mechanismen der Blutplättchenbildung beim Menschen erbracht.

Forschungsförderung

Dr. rer. nat. Wolf-Meinhard B e c k e r, Forschungszentrum Borstel, wurde eine Sachmittelbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) in Höhe von 29.000 Mark und Personalausstattung für das Projekt „Identifizierung und molekulare Charakterisierung von Allergenen der Erdnuss in verarbeiteten Nahrungsmitteln“ bewilligt.

Der Arbeitsgruppe Biosignalanalyse, Dr. rer. nat. Ulrich H o f m a n n, im Universitätsinstitut für Signalverarbeitung und Prozessrechenstechnik Lübeck wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen des Förderprogramms „Mikrostrukturtechnik 2000+“ eine Projektförderung über 36 Monate gewährt. Das von dem Lübecker Institut initiierte Projekt „navEgate“ wurde im Rahmen einer Ausschreibung als eines der wenigen Projekte in das Förderprogramm aufgenommen.

Zusammen mit den gleichfalls geförderten Industriepartnern BrainLAB AG, Uwe Thomas RECORDING GmbH und dem Institut für Mikrotechnik Mainz werden Vielkanal-Mikrosonden zur integrierten elektrophysiologischen und konventionellen Neuronavigation entwickelt, die die Ortsauflösung bei tiefen, stereotaktischen Hirnoperationen (z.B. Morbus Parkinson) auf unter 1 mm verbessern sollen. Von den bereitgestellten Projektmitteln des Bundesministeriums stehen der Arbeitsgruppe Biosignalanalyse 430.000 Mark zur Verfügung.

Die von Prof. Dr. med. Fritz H o h a g e n , Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie Lübeck, beantragte Forschergruppe „Neurobiologische Prädiktoren und Korrelate von Psychotherapie“ ist von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) positiv begutachtet worden. Das Drittmittelvolumen wird voraussichtlich bei ca. 5,5 bis 6 Millionen Mark liegen.

Dr. med. Cordula S t a m m e , Forschungszentrum Borstel, wurde eine Sachmittelbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) in Höhe von 62.600 Mark und Personalausstattung für das Projekt „Surfactant Protein-A-vermittelte Modulation der Immunzellaktivierung“ bewilligt.

Medizinische Gesellschaft zu Lübeck

Sitzung am 25. Oktober 2001:

Kardiale Arrhythmien – Pathogenese und aktuelle Behandlungsstrategien

Einführung und Moderation: Prof. Dr. med. Hugo A. Katus, Direktor der Medizinischen Universitätsklinik II

Warum flimmert das Herz? Rolle von Ischämie und autonomer Aktivität

Neben einer Vielzahl kardialer und auch nicht-kardialer Faktoren spielt die myokardiale Ischämie eine entscheidende Rolle in der Genese von Arrhythmien. So ist das Auftreten von Kammerflimmern im akuten Myokardinfarkt die Haupttodesursache noch vor Eintreffen des Notarztes bzw. Erreichen des Krankenhauses. Dies wird vorwiegend durch einen Anstieg der lokalen Katecholamine getriggert und über kardiale adrenerge Rezeptoren moduliert. Dieser Zusammenhang kann auch den prognostisch äußerst günstigen Einsatz von Betablockern begründen, insbesondere wenn er früh erfolgt. Aber auch neuere, zusätzlich alphablockierende Substanzen wie Carvedilol dürften hier einen protektiven Ansatz haben.

Auch wenn eine effektive Beseitigung der myokardialen Durchblutungsstörung z. B. durch Koronarintervention die vorrangige Maßnahme im Myokardinfarkt darstellt, kann es aber gerade durch die Reperfusion erneut zu arrhythmiefördernden Effekten kommen. Auch hier spielt die kardiale autonome Aktivität eine wichtige Rolle.

R. Tölg

Aktuelle Aspekte zur Genese und Therapie des Vorhofflimmerns

Vorhofflimmern ist im klinischen Alltag die am häufigsten vorkommende anhaltende Arrhythmie. Es ist eine Hauptursache des Schlaganfalls, insbesondere bei Älteren. Das Auftreten von Vorhofflimmern ist für die meisten Patienten mit Symptomen bzw. einer Beeinträchtigung ihrer Lebensqualität verbunden. Aktuelle Untersuchungen geben Einblick in die zugrundeliegenden Mechanismen des Vorhofflimmerns. Atrialer Vergrößerung bzw. myokardialer Dehnung kommt für die Entstehung und Unterhaltung von Vorhofflimmern eine besondere Bedeutung zu. So genanntes elektrisches Remodeling

des Vorhofmyokards führt zu einer Perpetuierung der Arrhythmie, ein begleitendes kontraktiles Remodeling beeinträchtigt die Funktion des Vorhofmyokards auch über die Beendigung des Vorhofflimmerns hinaus. Aus der Kenntnis solcher strukturellen Veränderungen in ihrem zeitlichen Verlauf ergeben sich Implikationen für die Therapie. Neben der Frequenzkontrolle und der Prävention einer Thrombembolie stellt der Erhalt des Sinusrhythmus ein wichtiges therapeutisches Ziel dar. In den letzten Jahren wurden verschiedene operative und ablativ Techniken erprobt, um der Initiierung und Unterhaltung von Vorhofflimmern entgegenzuwirken. Zur Terminierung von Vorhofflimmern wurden sowohl neue antiarrhythmische Substanzen eingeführt als auch Geräte entwickelt wie z. B. der Atrioverter oder Schrittmachersysteme mit antitachykarder Funktion.

F. Bode

Katheterablation von Herzrhythmusstörungen – derzeitiger Stand und Perspektiven für die Zukunft

Die Hochfrequenz-Katheterablationsbehandlung für supraventrikuläre Reentrytachykardien hat seit ihrer ersten Anwendung 1989 durch Martin Borggreffe eine rasche Verbreitung erfahren. Durch mehrere technische Fortschritte sind inzwischen die heute etablierten Indikationen mit hoher Erfolgsrate, geringem Eingriffsrisiko, niedriger Rezidivrate und reduzierter Strahlenbelastung durchführbar. Eigene Ablationsergebnisse werden im Vergleich zu Hochvolumen-Zentren und dem europäischen Ablationsregister präsentiert und an Fallbeispielen die heutigen Indikationen erläutert.

Seit wenigen Jahren wird die Katheterablation in experimentellen Arbeiten auch bei par-oxysmalem und chronischem Vorhofflimmern sowie bei ventrikulären Tachykardien eingesetzt. Bisherige Erfahrungen, aber auch Komplikationsrisiken werden dargestellt, um eine entsprechende Patientenaufklärung und -selektion zu erreichen. Praktische Fallbeispiele sollen den pathophysiologischen Hintergrund, das technische Vorgehen, den Untersuchungsablauf und die optimale Patientenselektion für inzwischen etablierte und auch neuere und künftige Ablationsindikationen verdeutlichen.

Physiologische Schrittmacherstimulation – welcher Patient profitiert?

Bei Patienten mit erhaltenem Sinusrhythmus sehen die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie die Therapie mit ventrikulären Bedarfsschrittmachern als suboptimal an. Grundlage für die Empfehlung zum Einsatz physiologischer Schrittmachersysteme (atriale Bedarfs- bzw. Zweikammerschrittmacher) war die Erwartung, dass eine hierdurch verbesserte Hämodynamik zu einer niedrigeren Mortalität und Vorhofflimmerinzidenz führen würde. Der Evidenzgrad dieser Annahme ist allerdings gering und basierte im wesentlichen auf Expertenkonsensus und retrospektiven Analysen. Zwei kürzlich vorgestellte große prospektiv-randomisierte Studien konnten zwar eine Reduktion der Vorhofflimmerinzidenz durch physiologische Stimulation nachweisen, ein Überlebensvorteil gegenüber Patienten mit ventrikulären Bedarfsschrittmachern fand sich allerdings nur in Subgruppen: Patienten mit einem Alter < 74 Jahre und Patienten mit einer Eigenfrequenz < 60/min profitierten signifikant von einer physiologischen Schrittmacherstimulation, alle übrigen Patienten nicht.

Nach derzeitigem Kenntnisstand kann also für ältere Patienten mit intermittierenden Blockierungen von Sinus- oder AV-Knoten die Implantation eines günstigen und weniger komplikationsträchtigen ventrikulären Bedarfsschrittmachers sinnvoll sein. Von der Therapie mit physiologischen Schrittmachersystemen profitieren insbesondere junge Patienten, Patienten mit hohem Stimulationsbedarf aufgrund von Sinusbradykardie oder permanentem hochgradigem AV-Block sowie solche mit paroxysmalem Vorhofflimmern.

U. Wiegand

Sitzung am 29. November 2001:

Arterielle Verschlusskrankheiten

Einführung und Moderation: Prof. Dr. med. Hugo A. Katus, Direktor der Medizinischen Universitätsklinik II

Operative Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit

Nach ersten zögerlichen Versuchen in den 40-er Jahren des letzten Jahrhunderts nahm die operative Therapie der arteriellen Verschlusskrankheit nach dem 2. Weltkrieg einen steilen Aufschwung. Gut verträgliche Kunststoffmaterialien und ständig optimiertes Nahtmaterial ermöglichten eine erhebliche Erweiterung des Therapiespektrums und neue Antikoagulantien (Thrombozytenaggregationshemmer, Heparine, Cumarine) verbesserten die Langzeitergebnisse. Aufgrund biomechanischer und flowtechnischer Untersuchungen konn-

te auch die operative Technik immer weiter verbessert werden. Dadurch ist es heutzutage möglich, durch geeignete operative Maßnahmen die Durchblutungssituation bei noch erhaltenem Abstromgebiet bis weit in die Peripherie hinein zu verbessern. Verbesserte Mobilität und ein Rückgang der Majoramputationsrate sind die Folge.

U. Markert

Prävention, Diagnostik und konservative Therapie arterieller Gefäßkrankheiten

Entscheidend für die Pathogenese systemischer arterieller Gefäßkrankheiten ist die Risikofaktoreinwirkung auf die primäre Endothelläsion. Dabei ist der gestörte Lipidstoffwechsel Schrittmacher im Atheroskleroseprozess.

In der apparativen Diagnostik von Krankheitsbildern peripherer und cerebraler arterieller Gefäßprovinzen ergänzen sich nichtinvasive und invasive sonographische und radiologische Untersuchungsverfahren (FDS, IVUS, MR-Angiographie, i. a. Angiographie). In der Differentialdiagnostik arterieller Ischämien ist die klinische und labordiagnostische Abgrenzung entzündlicher Gefäßkrankheiten wichtig. Im Vordergrund der konservativen Behandlung der Atherosklerose steht die Risikofaktorenintervention mit Optimierung von Lipid- und Zuckerstoffwechsel. Die Rolle der Thrombozyten-Funktionshemmung durch Acetylsalizylsäure oder Thienopyridine konnte in den vergangenen Jahren in klinischen Studien gut charakterisiert werden. Für die Bewertung rheologisch oder vasoaktiv wirksamer Substanzen in der Therapie peripherer und cerebraler Ischämien fehlen ebenso wie für den Gefäßsport in der PAVK-Therapie bisher moderne Interventionsstudien. Eine besondere Bedeutung kommt der Prävention und konservativen Therapie des diabetischen Fußsyndroms zu, um Mortalität, Hospitalisierungs- und Amputationsraten dieser Patientengruppe zu senken.

C. Knoll

Aktueller Stand der endovaskulären Therapieoptionen bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit

Nach einer kurzen Einleitung bezüglich der Rolle der pAVK im Gesamtbild der Arteriosklerose wird zu den interventionellen Therapiemöglichkeiten, aufgeteilt nach den verschiedenen Gefäßprovinzen, Stellung genommen. Die Schwerpunkte liegen dabei im Bereich der Becken- und Oberschenkelarteriellagen und mit kurzer Darstellung auch die Unterschenkelarteriellagen. In den jeweiligen Bereichen sollen neben etablierten Gefäßinterventionen auch Grenzfälle dargestellt werden. Das große Gebiet der Aortenerkrankungen muss ebenso wie der supraaortale Bereich aufgrund der begrenzten Vortragszeit ausgegrenzt werden.

V. Geist

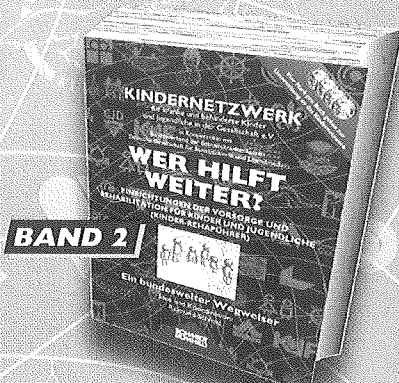
WER HILFT WEITER?

Schwer heilbare Krankheiten?

(Sexuelle) Gewalt gegen Kinder?

Behinderungen?

Rehabilitation?



Bundesweite Wegweiser für Eltern und Ärzte

Schwer heilbare Krankheiten und Behinderungen bei Kindern stellen Eltern vor ganz spezielle Herausforderungen, denen sie allein oft nicht gewachsen sind. Deshalb hat das „Kindernetzwerk für kranke und behinderte Kinder und Jugendliche in der Gesellschaft“ unter dem Motto „Wer hilft weiter?“ eine bundesweit einmalige Reihe von Wegweisern herausgebracht, an der sich Eltern bei der Suche nach Hilfe orientieren können. Nach dem im Juni '99 neu aufgelegten bundesweiten Wegweiser über Eltern-Selbsthilfegruppen und dem „Kinder-Rehaführer“ ist nun auch ein Wegweiser zum Thema „(Sexuelle) Gewalt gegen Kinder und Jugendliche – Wer hilft weiter?“ erschienen. Betroffene finden in jedem Band eine ausführliche Zusammenstellung von Initiativen, Einrichtungen und Beratungsstellen mit Beschreibung in Stichworten und Kontaktadressen. Jeder Wegweiser enthält außerdem ein umfassendes Vorwort, das über den aktuellen Diskussionsstand und die Problematik des jeweiligen Themas informiert. Gerade für (Kinder-) Ärzte bietet die Reihe einen sinnvollen Überblick, der bei der Beratung der Patienteneltern helfen kann.

BESTELLEN SIE JETZT!

**SCHMIDT
RÖMHILD**

Verlag Schmidt-Römhild, Mengstr. 16, 23552 Lübeck
FAX: (04 51) 70 31-2 81, Tel. (04 51) 70 31-2 13

Hiermit bestelle/n ich/wir:

_____ Expl. Wer hilft weiter? Bd.1:
Chronische Erkrankungen und Behinderungen bei Kindern und Jugendlichen. Ein bundesweiter Wegweiser über (Eltern-) Selbsthilfegruppen
ca. 800 Seiten, ISBN 3-7950-1909-5,
48,- DM/350,- öS/44,50 sFr

_____ Expl. Wer hilft weiter? Bd.2:
Einrichtungen der Vorsorge und Rehabilitation für Kinder und Jugendliche (Kinder-Rehaführer). Ein bundesweiter Wegweiser.
306 Seiten, ISBN 3-7950-1907-9,
36,- DM/263,- öS/33,- sFr

_____ Expl. Wer hilft weiter? Bd.3:
(Sexuelle) Gewalt gegen Kinder und Jugendliche. Ein bundesweiter Wegweiser.
480 Seiten, ISBN 3-7950-1908-7,
39,80 DM/291,- öS/37,- sFr

Name/Vorname _____

Vorwahl/Telefon _____

Straße/Hausnummer _____

PLZ/Ort _____

Datum/Unterschrift _____



Einfach physiologisch

ClinOleic 20 %. Zusammensetzung: 100 ml Emulsion enthalten: Arzneilich wirksame Bestandteile: Olivenöl und Sojabohnenöl* 20,00 g entsprechend einem Gehalt essentieller Fettsäuren von 4,00 g.

*Mischung aus Olivenöl (80 %) und Sojabohnenöl (20 %). Sonstige Bestandteile: Eilecithin 1,20 g, Glycerol 2,25 g, Natriumoleat 0,03 g, Natriumhydroxid (zur pH-Einstellung), Wasser für Injektionszwecke. Energiegehalt: 2000 kcal/l (8360 kJ/l). Fettgehalt (Oliven- und Sojabohnenöl) 200 g/l, Osmolarität 270 mOsm/l, pH-Wert 7 - 8, Dichte 0,986, Phospholipide, entsprechend 47 mg oder 1,5 mmol Phosphor pro 100 ml. Anwendungsgebiete: Fettzufuhr für parenteral ernährte Patienten, für die eine orale oder enterale Ernährung unmöglich, unzureichend oder kontraindiziert ist. Gegenanzeigen: bekannte Allergie gegenüber Ei- oder Sojabohnenprotein, schwere Fettstoffwechselstörungen und nicht korrigierte Stoffwechselstörungen wie Laktazidose und entgleiste diabetische Stoffwechselsituation, schwere Sepsis, schwere Lebererkrankungen, Blutgerinnungsstörungen, Thrombophlebitis, akutes und chronisches Nierenversagen; keine spezifischen Studien vorhanden, Myokardinfarkt Anwendung während Schwangerschaft und Stillzeit: Zur Anwendung von ClinOleic 20 % während der Schwangerschaft und der Stillzeit liegen keine Daten vor. Aus diesem Grund ClinOleic 20 % während Schwangerschaft und Stillzeit nur nach strenger Indikationsstellung verabreichen.

Nebenwirkungen: Wenn zu Beginn der Infusion eine der folgenden Frühreaktionen (Schwitzen, Zittern, Kopfschmerzen, Atemnot) auftritt, die Infusion sofort abbrechen. Während einer parenteralen Langzeiternährung wurden folgende Nebenwirkungen beobachtet: erhöhte Konzentrationen an alkalischen Phosphatasen, Transaminasen und Bilirubin, selten: Hepatomegalie und Gelbsucht, moderate Thrombozytopenie. Bitte informieren Sie Ihren Arzt oder Apotheker über auftretende Nebenwirkungen, besonders jene, die nicht in der Gebrauchsinformation aufgeführt sind. **Vorsichtsmaßnahmen für die Anwendung und Warnhinweise:** Beim geringsten Anzeichen einer anaphylaktischen Reaktion (wie zum Beispiel Fieber, Frösteln, Hautrötung, Atemnot etc.) die Infusion sofort abbrechen. Plasmatriglyceridspiegel und Plasmatriglyceridclearance täglich messen. Unter laufender Infusion darf die Triglyceridkonzentration im Serum 3 mmol/l nicht überschreiten. Mit der Infusion erst beginnen, wenn die Triglyceridkonzentration im Serum auf den Ausgangswert zurückgegangen ist. Bei intravenöser Langzeit- oder Kurzzeiternährung je nach Gesundheitszustand des Patienten die alkalischen Phosphatasen und das Gesamt-Bilirubin regelmäßig bestimmen. Störungen des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes oder Stoffwechselstörungen vor der Verabreichung von ClinOleic 20 % korrigieren. Fettmulsionen zusammen mit Kohlenhydraten und Aminosäuren verabreichen, um eine metabolische Azidose zu vermeiden. Blutzucker, Säure-Basen-Haushalt, Elektrolyte, Wasserhaushalt und Blutbild unbedingt regelmäßig überprüfen. Vor dem Gebrauch überprüfen, daß die Emulsion homogen ist und die Flasche keine Risse oder Splitter aufweist.

Pharmazeutischer Unternehmer: Baxter Deutschland GmbH,
Edisonstr. 3-4, D-85716 Unterschleißheim, Tel.: (089) 3 17 01-0

- Die erste Fettmulsion aus 80% Olivenöl und 20% Sojabohnenöl
- Ausgewogenes Fettsäurenmuster
- Gewährleistung der Synthese höherer Derivate (metabolische Effizienz)
- Schutz der Immunfunktion
- Ausgezeichnete Stabilität auch in Mischinfusionen
- Geringe Peroxidbildung
- Positiver Einfluß auf den Antioxidantienstatus

Jetzt auch für die
Pädiatrie

ClinOleic®

Lösungen & Therapiesysteme

Baxter