

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert

**AKUTE EFFEKTE VON CORTICOLIBERIN (CRH) AUF
DEN FETTGEWEBSMETABOLISMUS *IN VIVO***

**INAUGURALDISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DER UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
- AUS DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT -**

vorgelegt von

Maik Welzel
aus Wildeshausen

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. C. Dodt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Merz

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.08

Zum Druck genehmigt, Lübeck den: 10.10.08

Gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1 | DIE PHYSIOLOGIE DES WEIßEN FETTGEWEBES | 1 |
| 1.2 | HPA-ACHSE..... | 3 |
| 1.3 | ROLLE DES CRH IN DER ENERGIEHOMÖOSTASE | 5 |
| 1.4 | THEMA UND FRAGESTELLUNG..... | 7 |
| 2 | <u>MATERIAL UND METHODEN</u> | 8 |
| 2.1 | VERSUCHSPERSONEN..... | 8 |
| 2.2 | ALLGEMEINER VERSUCHSABLAUF..... | 8 |
| 2.3 | LASER DOPPLER FLOWMETRIE ZUR BESTIMMUNG DES SUBKUTANEN BLUTFLUSSES .. | 12 |
| 2.3.1 | ALLGEMEINE GRUNDLAGEN | 12 |
| 2.3.2 | DURCHFÜHRUNG DER LDF | 13 |
| 2.4 | DIE MIKRONEUROGRAPHIE | 13 |
| 2.4.1 | ALLGEMEINE GRUNDLAGEN | 13 |
| 2.4.2 | TECHNISCHE GRUNDLAGEN | 15 |
| 2.4.3 | DURCHFÜHRUNG DER PUNKTION | 15 |
| 2.5 | MIKRODIALYSE ZUR BESTIMMUNG DES SUBKUTANEN FETTGEWEBESMETABOLISMUS .. | 16 |
| 2.5.1 | ALLGEMEINE GRUNDLAGEN UND DURCHFÜHRUNG..... | 16 |
| 2.6 | ANALYTIK DER PROBEN | 18 |
| 2.6.1 | BLUTPROBEN..... | 18 |
| 2.6.2 | MIKRODIALYSAT..... | 19 |
| 2.6.3 | STATISTIK | 20 |
| 3 | <u>ERGEBNISSE</u> | 21 |
| 3.1 | SYMPATHISCHE NERVENAKTIVITÄT..... | 21 |
| 3.2 | MIKRODIALYSE | 22 |
| 3.2.1 | GLYCEROL | 22 |
| 3.2.2 | LAKTAT | 23 |
| 3.2.3 | GLUKOSE..... | 23 |
| 3.3 | PLASMA- UND SERUMKONZENTRATIONEN | 24 |
| 3.3.1 | GLYCEROL | 24 |
| 3.3.2 | LAKTAT | 26 |

| | | |
|-----------------|--|------------------|
| 3.3.3 | GLUKOSE | 26 |
| 3.3.4 | FREIE FETTSÄUREN | 27 |
| 3.3.5 | ACTH..... | 27 |
| 3.3.6 | CORTISOL..... | 28 |
| 3.4 | GEWEBSPERFUSION..... | 29 |
| 3.4.1 | HAUTPERFUSION | 29 |
| 3.4.2 | SUBKUTANE PERFUSION | 30 |
| 3.5 | VITALPARAMETER | 31 |
| 3.5.1 | HERZFREQUENZ..... | 31 |
| 3.5.2 | BLUTDRUCK..... | 32 |
| <u>4</u> | <u>DISKUSSION</u> | <u>33</u> |
| 4.1 | CRH-EFFEKTE AUF DIE PERFUSION VON HAUT UND UNTERHAUTFETTGEWEBE | 33 |
| 4.2 | GLYCEROL UND FREIE FETTSÄUREN..... | 35 |
| 4.3 | LAKTAT..... | 37 |
| 4.4 | GLUKOSE | 38 |
| 4.5 | DAUER DER CRH-EFFEKTE | 40 |
| 4.6 | KLINISCHE BEDEUTUNG UND AUSBLICK..... | 40 |
| <u>5</u> | <u>ZUSAMMENFASSUNG</u> | <u>43</u> |
| <u>6</u> | <u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u> | <u>45</u> |
| <u>7</u> | <u>ANHANG</u> | <u>51</u> |
| 7.1 | LISTE DER VERWENDETEN MATERIALIEN | 51 |
| 7.2 | PROBANDENAUFKLÄRUNG..... | 52 |
| 7.3 | LEBENSLAUF | 55 |
| 7.4 | DANKSAGUNG..... | 57 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| ABBILDUNG 1-1: PROZESSIERUNGSPRODUKTE VON PRO-OPIOMELANOCORTIN (POMC)..... | 3 |
| ABBILDUNG 1-2: ZIRKADIANE RHYTHMIK DER CORTISOL-AUSSCHÜTTUNG | 4 |
| ABBILDUNG 2-1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHSABLAUFES | 11 |
| ABBILDUNG 2-2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES LASER-DOPPLER-PRINZIPS..... | 12 |
| ABBILDUNG 2-3: ABLEITUNG DER SYMPATHISCHEN AKTIVITÄT IN DER HAUT (SSA) IN MV ÜBER 30 SEKUNDEN. | 14 |
| ABBILDUNG 2-4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MIKRODIALYSE | 17 |
| ABBILDUNG 3-1: SSA VOR UND NACH INJEKTION VON PLACEBO- ODER CRH | 21 |
| ABBILDUNG 3-2: INTERSTITIELLE GLYCEROL-KONZENTRATIONEN IM SUBKUTANEN FETTGEWEBE DES LATERALEN OBERSCHENKELS VOR UND NACH CRH-/PLACEBO-GABE. | 22 |
| ABBILDUNG 3-3: INTERSTITIELLE LAKTAT-KONZENTRATIONEN IM SUBKUTANEN FETTGEWEBE DES LATERALEN OBERSCHENKELS VOR UND NACH CRH-/PLACEBO-GABE. | 23 |
| ABBILDUNG 3-4: INTERSTITIELLE GLUKOSE-KONZENTRATIONEN IM SUBKUTANEN FETTGEWEBE DES LATERALEN OBERSCHENKELS VOR UND NACH CRH-/PLACEBO-GABE. | 24 |
| ABBILDUNG 3-5: PLASMA-GLYCEROL-KONZENTRATIONEN VOR UND NACH CRH-GABE. | 25 |
| ABBILDUNG 3-6: PLASMA-LAKTAT-KONZENTRATIONEN VOR UND NACH VERUM-/PLACEBO-GABE | 26 |
| ABBILDUNG 3-7: PLASMA-GLUKOSE-KONZENTRATIONEN VOR UND NACH VERUM-/PLACEBO-GABE, MITTELWERTE \pm SEM, N = 12..... | 26 |
| ABBILDUNG 3-8: PLASMA-KONZENTRATIONEN DER FREIEN FETTSÄUREN (FFA) VOR UND NACH INTRAVENÖSER CRH-GABE GEGENÜBER PLACEBO. | 27 |
| ABBILDUNG 3-9: PLASMA-ACTH-SPIEGEL VOR UND NACH PLACEBO-/CRH-GABE.MITTELWERTE..... | 28 |
| ABBILDUNG 3-10: SERUM-CORTISOL-SPIEGEL VOR UND NACH PLACEBO-/CRH-GABE..... | 28 |
| ABBILDUNG 3-11: HAUTPERFUSION VOR UND NACH VERUM-/PLACEBO-GABE. | 29 |
| ABBILDUNG 3-12: FETTGEWEBSPERFUSION VOR UND NACH VERUM-/PLACEBO-GABE. | 30 |
| ABBILDUNG 3-13: HERZFREQUENZ VOR UND NACH PLACEBO-/CRH-GABE. | 31 |
| ABBILDUNG 3-14: SYSTOLISCHER UND DIASTOLISCHER BLUTDRUCK IN MMHG VOR UND NACH PLACEBO/CRH. | 32 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| α -MSH | α -Melanocyten-stimulierendes Hormon |
| β -LPH | β -Lipotropin |
| ACTH | Adrenocorticotropes Hormon |
| ANOVA | Analysis of variance/Varianzanalyse |
| BMI | Body-Mass-Index |
| CRH | Corticotropin-Releasing Hormon/Corticoliberin |
| CRH-bp | CRH-Bindungsprotein |
| CRH-R | CRH-Rezeptor |
| CV | Coefficient of variance/Variationskoeffizient |
| HPA-Achse | Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse |
| LDF | Laser-Doppler-Flowmetrie |
| MD | Mikrodialyse |
| MSA | Sympathetic muscular activity, muskuläre Sympathikusaktivität |
| SD | Standardabweichung/Standard deviation |
| SEM | Standard error of the mean |
| SSA | Skin sympathetic activity |

1 EINLEITUNG

Die Adipositas - zu deutsch, Fettsucht - ist ein wachsendes Problem in der westlichen Welt, verursacht durch Fehlernährung, Bewegungsmangel und genetische Faktoren (1). Kennzeichnend sind eine Zunahme der Masse des weißen Fettgewebes und damit einhergehende Folgeerkrankungen wie Atherosklerose, Hypertonie, Dyslipidämie und eine gestörte Glukosehomöostase. Die Kombination dieser Erkrankungen wurde 1988 von Reaven et al. unter dem Namen „Metabolisches Syndrom“ zusammengefasst (2). Es wird geschätzt, dass im deutschen Gesundheitssystem die ernährungsbedingten Krankheiten bereits einen Kostenanteil von ca. 30% der Gesamtausgaben ausmachen (Bayrisches Amt für Gesundheit). Dies erklärt, warum die Erforschung des Fettgewebes in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen hat und verdeutlicht, wie wichtig es ist, den Fettgewebsmetabolismus möglichst genau zu verstehen, um so die Grundlage für neue effektive Therapie-Ansätze zu schaffen.

1.1 DIE PHYSIOLOGIE DES WEIßEN FETTGEWEBES

Der mittlere Fettgehalt des Menschen beträgt ca. 20 Prozent, kann aber entsprechend der Ernährungssituation erheblich davon abweichen (3). Das Fettgewebe kann in zwei verschiedene Typen – weißes und braunes Fettgewebe – unterteilt werden. Das braune Fettgewebe findet sich vor allem beim Säugling. Es macht ca. 2-5 Prozent des Gesamtkörpergewichtes aus und dient der Thermogenese. Beim Erwachsenen spielt es nur eine untergeordnete Rolle und wird daher im Folgenden nicht weiter abgehandelt. Das weiße Fettgewebe hat mehrere Funktionen: Es dient dem Körper als Energiereservoir, zur thermischen Isolierung und erfüllt mechanische Aufgaben (3). Zusätzlich fungiert es als endokrines Organ, das eng in den Energiehaushalt eingebunden ist.

Mit der Nahrung zugeführte Triglyceride werden in den Vakuolen der Adipozyten gespeichert und können in Fastenperioden in die Bestandteile Glycerin und Fettsäuren gespalten werden (Lipolyse). Die dabei freigesetzten Fettsäuren werden

zur Energiegewinnung genutzt. Der Auf- und Abbau des Fettgewebes unterliegt vielen verschiedenen Faktoren. So wird die Lipolyse durch Insulin und sympathische α_2 -Rezeptor-Stimulation gehemmt, während sie durch Stimulation von β -Rezeptoren (Subtyp 1-3) gefördert wird (4;5). Die zentrale Bedeutung des sympathischen Einflusses bei der Genese der Adipositas verdeutlichen Studien, die eine verminderte Sympathikus-vermittelte Lipolyse bei adipösen Patienten nachweisen konnten (6). Des Weiteren wurden verschiedene Adrenozeptor-Mutationen beschrieben, die mit einer erhöhten Adipositas-Inzidenz einhergehen (7). Lange Zeit schien es, als gäbe es keinen parasympathischen Einfluss auf den Fettgewebsstoffwechsel. Der Nachweis parasympathischer Neurone, deren Aktivierung zu einer erhöhten Insulin-vermittelten Aufnahme von freien Fettsäuren (FFA) und Glukose führt, ist mittlerweile zumindest am Versuchstier erbracht worden (8).

Ein weiterer Faktor, der den Fettgewebsmetabolismus beeinflusst, ist die Durchblutung. Hormone, FFA, etc. müssen in das Fettgewebe hinein bzw. heraus transportiert werden. Daher ist das Fettgewebe, anders als früher angenommen, sehr gut vaskularisiert. Der Gefäßtonus unterliegt unter anderem ebenfalls der Regulation durch das sympathische Nervensystem: Eine α -Rezeptor-Stimulation bewirkt eine Vasokonstriktion, die Vasodilatation wird durch β -Rezeptoren vermittelt (9).

In den letzten Jahren und Jahrzehnten musste die bis dahin geltende Hypothese, das weiße Fettgewebe sei ein reines Speicherorgan, verworfen werden. In den 60ern und 70ern des 20. Jahrhunderts wurden zunehmend neurale Einflüsse auf das Fettgewebe herausgearbeitet. Aber erst 1987 wurde es als eine der Hauptmetabolisierungsorte für Sexualsteroiden identifiziert und die endokrinologische Bedeutung ersichtlich (10). 1994 beschrieb Zhang erstmals das Leptin als einen vom Fettgewebe produzierten Botenstoff, der über zentrale Rückkopplungsmechanismen das Essverhalten veränderte (11). Mittlerweile sind zahlreiche weitere vom Fettgewebe produzierte Hormone - Adipokine genannt - sowie Rezeptoren, die im Fettgewebe exprimiert werden, beschrieben und in ihrer Funktionsweise aufgeklärt worden. Zwei große Gruppen können demnach unterschieden werden: Erstens Proteine mit metabolischem Effekt auf entfernte Zellen und Gewebe und zweitens Enzyme, die in

den Metabolismus von Steroidhormonen involviert sind (12). Auf der anderen Seite ist eine Vielzahl von Hormonen bekannt, die auf die Adipozyten und deren metabolische Funktion einen Einfluss ausüben. Neben dem Insulin sind dies unter anderem die Hormone der HPA-Achse, die für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung sind.

1.2 HPA-ACHSE

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) ist ein zentrales Steuerelement der menschlichen Stressantwort (13). CRH, als oberstes Steuerhormon der HPA-Achse, ist ein aus 41 Aminosäuren bestehendes Peptid, das in den Nuclei paraventricularis und supraopticus des Hypothalamus gebildet wird. Es wurde erstmals gleichzeitig Guillemin und Rosenberg sowie Saffran und Schally beschrieben (14;15) aber erst 1981 vollständig von Vale und Mitarbeitern charakterisiert (16). Über den portalen hypothalamo-hypophysären Kreislauf gelangt es zur Hypophyse und bewirkt dort über CRH-Rezeptoren die Freisetzung des in der Adenohypophyse gebildeten Adrenocorticotropin (ACTH). ACTH wird aus einem so genannten Precursor, dem Proopiomelanocortin (POMC) abgespalten (s. Abbildung 1-1). Zusätzlich zum ACTH entstehen dabei u.a. α -MSH (Melanocyten stimulierendes Hormon), β -Lipotropin und β -Endorphin.

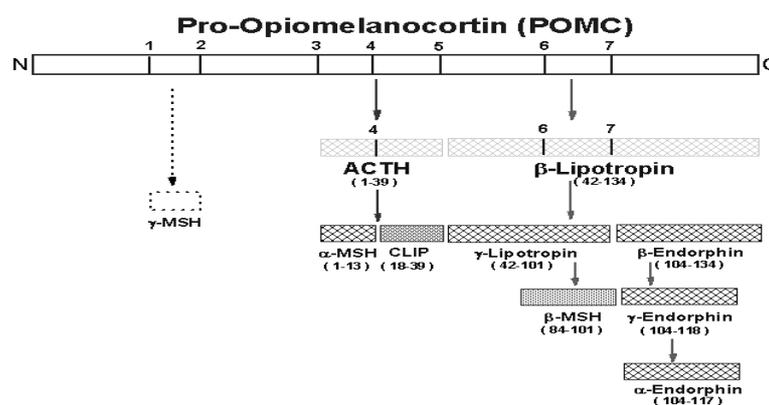


Abbildung 1-1: Prozessierungsprodukte von Pro-Opiomelanocortin (POMC). Abkürzungen: Adrenocorticotropin (ACTH), Melanocyten stimulierendes Hormon (MSH), Corticotropin-ähnliches intermediäres Peptid (CLIP).

Über die Blutzirkulation gelangt ACTH zur Nebennierenrinde, wo es die Synthese und Freisetzung von Cortisol stimuliert, welches seinerseits über ein negatives Feedback die Produktion von CRH und ACTH hemmt und somit den Regelkreislauf schließt (17). Die physiologische ACTH- und Cortisolausschüttung erfolgt pulsatil und unterliegt einer zirkadianen Rhythmik: Am höchsten ist die Konzentration im Blut in den frühen Morgenstunden. Danach fällt sie kontinuierlich ab, bis sie gegen Mitternacht ihren Tiefpunkt erreicht (vgl.

Abbildung 1-2).

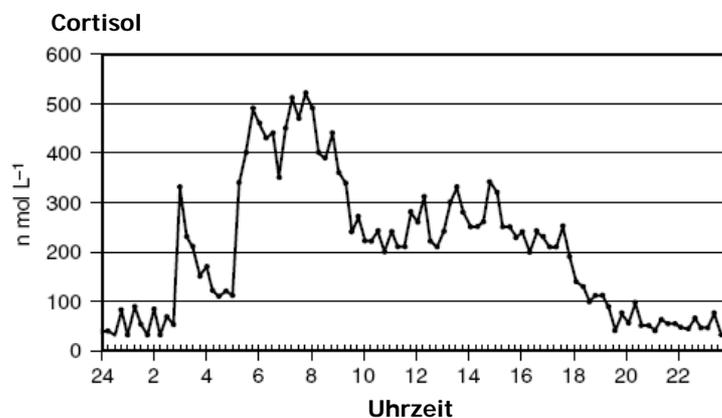


Abbildung 1-2: Zirkadiane Rhythmik der Cortisol-Ausschüttung, modifiziert nach (18)

Wie alle Steroidhormone, wird Cortisol aus dem gemeinsamen Vorläufer Cholesterin synthetisiert. In der Nebennierenrinde geschieht dies vorwiegend in der Zona fasciculata und Zona reticularis. Zusätzlich entsteht Cortisol in peripheren Geweben durch die Konversion der inaktiven Vorstufe Cortison durch die 11- β -Hydroxysteroiddehydrogenase (11 β -HSD), von der zwei Subtypen – 11 β -HSD1 und 11 β -HSD2 – existieren. Dabei katalysiert die 11 β -HSD1 vorwiegend die Konversion von Cortison zu Cortisol und die 11 β -HSD2 die entgegengesetzte Reaktion. Die 11 β -HSD wird in vielen Geweben exprimiert, unter anderem auch im subkutanen Fettgewebe (11 β -HSD1, (19)).

In der Peripherie hat Cortisol metabolische (z.B. Steigerung der Gluconeogenese, anaboler Stoffwechsel, Erhöhung der FFA) und entzündungshemmende Effekte. Zusätzlich dient es der Stressanpassung durch einen permissiven Effekt auf die Wirkung von Katecholaminen (13), indem es die Katecholaminsensitivität erhöht (20). Auch das in der Hypophyse gebildete ACTH entfaltet metabolische Effekte: Im Fettgewebe der Maus konnten ACTH-Rezeptoren und eine ACTH-vermittelte Lipolyse nachgewiesen werden (21). Beim Menschen führt ACTH zu einer Sympathikusaktivierung (22), eine Lipolyse konnte jedoch nicht belegt werden (21;23).

1.3 ROLLE DES CRH IN DER ENERGIEHOMÖOSTASE

CRH ist das hypothalamische Peptid, das die ACTH-Sekretion der Hypophyse steuert. Seine Wirkung entfaltet das Peptid über spezifische CRH-Rezeptoren, von denen beim Menschen bisher 2 Subtypen – CRH-R1 und CRH-R2 – beschrieben wurden (24). Die CRH-R sind siebenfach membrangängige, G_s-Protein gekoppelte Peptide, die nach der Liganden-Bindung unter anderem zu einer Aktivierung Adenylatzyklase-abhängiger Signalkaskaden führen. Weitere Signaltransduktionswege schließen das Stickstoffmonoxid/cGMP-System, MAP-Kinasen oder die Proteinkinase C ein. CRH-R1 finden sich vorwiegend im ZNS, wo sie an der hypophysären Steuerung beteiligt sind (25) und weniger in peripheren Organen. Dagegen werden CRH-R2 vorwiegend in der Peripherie, z.B. in der Haut, im Myometrium, am Herzen sowie im Fettgewebe exprimiert (24;26;27). Ein CRH-R3, der bei Nagern beschrieben wurde, konnte beim Menschen bislang noch nicht identifiziert werden. Seres et al. zeigten, dass sich die Verteilung im subkutanen und visceralen Fettgewebe die Verteilung der CRH-R unterscheidet. So werden CRH-R1 mehr im subkutanen, CRH-R2 vorwiegend im visceralen Fettgewebe exprimiert. Diese Rezeptorverteilung legt nahe, dass CRH nicht nur zentrale sondern auch periphere Effekte auf den Energiehaushalt hat. *In vitro*-Studien konnten zeigen, dass eine 24-stündige Inkubation von Adipozyten mit CRH zu einer Herabsetzung der Lipolyse (19) und zu einer Down-Regulation von CRH-Rezeptoren (28) führt. So entsteht ein enges Zusammenspiel zwischen Hypothalamus

und Fettgewebe bei der Regulation des Appetits, des Gewichts und der Aufrechterhaltung des Energiehaushaltes (29-32).

Smith et al. belegten eine CRH-vermittelte Steigerung des Energie-Umsatzes *in vivo* mittels indirekter Kalorimetrie (29). Demnach führte CRH zur Zunahme der Fettoxidation, ohne dass eine erhöhte Lipolyserate nachgewiesen werden konnte. Die Arbeitsgruppe konnte keine Erhöhung der Katecholamine im Urin oder Plasma feststellen. Demgegenüber legen allerdings Tierversuche eine sympathoexzitatorische Wirkung von CRH nahe (33;34)

Zusätzlich zum CRH existieren Liganden, die durch Bindung an den CRH-R CRH-Effekte generieren. Im Mausmodell werden sie als Urocortine (Nr. I – III) bezeichnet (32). Beim Menschen lassen sich Urocortin und Stresscopin nachweisen, wobei das menschliche Urocortin dem murinen Urocortin I und das Stresscopin dem Urocortin III entspricht. Die Effekte der beiden Liganden am CRH-R sind stärker als die von CRH, die genaue physiologische Bedeutung ist allerdings noch nicht geklärt. Bekannt ist hingegen, dass Stresscopin mit hoher Affinität an CRH-R2, Urocortin dagegen verstärkt an CRH-R1 bindet. Auch im Fettgewebe lassen sich die beiden Liganden exprimieren. Die Arbeitsgruppe um Bornstein wies Urocortin vermehrt im subkutanen und Stresscopin im visceralen Fettgewebe nach (28).

1.3.1.1 NICHT-METABOLISCHE WIRKUNGEN INTRAVENÖSER CRH-GABE

Die Gabe von rekombinantem humanen CRH (hCRH) führt zu einer Vasodilatation, verbunden mit einem geringfügigen Blutdruckabfall sowie einer häufig auftretenden Flush-Symptomatik (35). Eine Arbeitsgruppe um Crompton konnte zeigen, dass die Vasodilatation Mastzell-abhängig vermittelt wird (36). Dies erklärt auch weitere Symptome wie Tachykardie, Unwohlsein und Hautjucken. Bei Asthmatikern kann CRH einen anaphylaktischen Schock auslösen. Insgesamt dauern die CRH-Effekte nur wenige Minuten an, da intravenös appliziertes CRH mit 30 Minuten eine kurze Halbwertszeit hat. Diese ist einerseits auf den Abbau durch Peptidasen, andererseits eine Inaktivierung durch Bindung an das CRH-Bindungsprotein (CRH-BP) zurück zu führen (37).

1.4 THEMA UND FRAGESTELLUNG

CRH wird eine zentrale Rolle bei der Regulation des Energiehaushaltes zugeschrieben. So konnte in Experimenten an Ratten ein anorektischer Effekt (38;39) und eine zentrale Erhöhung der Katecholamine (40) durch CRH nachgewiesen werden. Über die Wirkungen von CRH auf das subkutane Fettgewebe **beim Menschen** ist bislang wenig bekannt. Die bisherigen Studien haben einen großen Beitrag zum Verständnis der CRH-Wirkung auf das Fettgewebe *in vitro* erbracht. Zur Wirkung von CRH *in vivo* liegen derzeit jedoch nur wenige Erkenntnisse vor. Die vorliegende Arbeit untersucht daher die Wirkungen von CRH auf den Fettgewebsmetabolismus und die sympathische Nervenaktivität *in vivo*. Sie soll folgende Fragen klären:

1. Erhöht intravenös appliziertes CRH die Lipolyse im subkutanen Fettgewebe und falls ja, ist diese nur lokal begrenzt oder auch systemisch nachweisbar?
2. Erhöht intravenös appliziertes CRH die Durchblutung von Haut und subkutanem Fettgewebe?
3. Wird durch CRH die sympathische Nervenaktivität zum Fettgewebe moduliert?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 VERSUCHSPERSONEN

Die mikrovaskulären Effekte von CRH in der Haut zeigen deutliche Geschlechtsunterschiede (41). Untersucht wurden daher 12 normalgewichtige Frauen im Alter zwischen 20 und 37 Jahren ($25,42 \pm 4,23$ Jahre, Range 20-37 Jahre; Körpermassenindex (BMI) $22,75 \pm 1,33$ kg/m² [Mittelwert \pm SD]). Die Rekrutierung erfolgte über Aushänge in den Gebäuden der Universität Lübeck. Alle Probandinnen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung gesund, nahmen keine Medikamente (inkl. Kontrazeption) ein und rauchten nicht. Sie waren in den letzten 3 Monaten gewichtsstabil und hatten die Woche vor dem Versuch keine exzessiven körperlichen Anstrengungen, z.B. Extremsport oder Nachtarbeit, unternommen. Die Probandinnen wurden gebeten, nüchtern (Fastenperiode von mindestens 4 Stunden) zum Versuch zu erscheinen. Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Universität zu Lübeck genehmigt (AZ 01-023). Alle Probandinnen wurden ausführlich schriftlich und mündlich über die Untersuchung und mögliche Komplikationen aufgeklärt und legten Ihr Einverständnis zur Teilnahme schriftlich nieder.

2.2 ALLGEMEINER VERSUCHSABLAUF

Die Versuche wurden um 8 Uhr, respektive 13 Uhr im Labor der Medizinischen Klinik 1 der Universität zu Lübeck bei einer Raumtemperatur von $24 \pm 2^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die Probandinnen wurden entweder nur vormittags oder nur nachmittags untersucht, um zirkadiane Einflüsse auf die Untersuchungsergebnisse zu standardisieren. Der Mindestabstand zwischen zwei Versuchen betrug 4 Tage.

Vor Versuchsbeginn wurde das Gewicht, die Größe, der Hüft- und Taillenumfang sowie die Hip/Waist-Ratio gemäß den WHO-Normen bestimmt. Die Probandinnen wurden in halb sitzender Position in einem Bett gelagert. Anfangs wurde ein Mikrodialysekatheter (CMA 60, Membranlänge 30 mm, Cut-off 20 kDalton; Carnegie

Medical, Stockholm, Schweden) in das subkutane Fettgewebe des Oberschenkels eingebracht und mittels einer Mikroinjektionspumpe (Carnegie Medical, Stockholm, Schweden) mit einer Kochsalzlösung (CMA Perfusion Fluid T1; Carnegie Medical, Stockholm, Schweden) jeweils 30 Minuten bei einer Flussgeschwindigkeit von 2.5 µl/min und 0.5 µl/min perfundiert, um durch das Insertionstrauma entstandene Metaboliten auszuwaschen. Während dieser Zeit wurden die restlichen Messinstrumente angelegt: Die Blutdruckmessung erfolgte photoplethysmographisch mittels kontinuierlich gemessener Volumenänderung am Mittelglied des Mittelfingers (Finapres™, Ohmeda Monitoring System, Englewood; Colorado, USA) und einem handelsüblichen Blutdruckmessgerät am Oberarm (Welch Allyn™, Skaneateles Falls, NY, USA), mit dem Vergleichsmessungen durchgeführt wurden. Die Blutdruckmessung mittels der Finapres®-Methode wurde in vorhergehenden Studien bereits validiert (42). Die kontinuierliche Überwachung der Herz- und Atemfrequenz erfolgte über ein Standard 3- Pol EKG und ein Dehnungselement (Pneumotrace® 1130 ADInstruments, Spechbach, Deutschland) welches entweder um die Brust oder den Oberbauch, entsprechend des Ortes der größten Atemexkursion, angelegt wurde. Die Punktion des Nervus cutaneus lat. zur Ableitung der sympathischen Nervenaktivität erfolgte wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben. Zur Aufzeichnung der ermittelten Daten wurde ein Personal Computer mit der Powerlab®-Software (ADInstruments, Spechbach, Deutschland) verwendet. Die Blutentnahmen und die Medikamentenapplikation (100 µg CRH [Ferring, Kiel, Deutschland] in 1 ml NaCl 0,9% NaCl) erfolgten über einen peripheren venösen Zugang in der Cubitalvene (Venflon™ 1.0 x 25 mm). Mittels einer 0.9 %-igen NaCl-Lösung wurde dieser durchgängig gehalten (Flussgeschwindigkeit <50 ml/h). Die Blutproben wurden sofort nach Entnahme im Eisbad gelagert, nach Beendigung des Versuches abzentrifugiert (10 min bei 3000 U/min) und anschließend bis zur Auswertung bei -80°C tiefgefroren. Abbildung 2-1 zeigt eine schematische Übersicht des Versuchsablaufes. Nach einer 30-minütigen Ruhephase, in der alle Parameter als Ausgangswert bestimmt wurden, erfolgte die intravenöse Placebo- oder Verum-Gabe. Die Probandinnen wurden insgesamt für weitere zwei Stunden beobachtet. 90 Minuten nach Applikation erfolgte

eine intraneurale Stimulation für 10 Minuten bei einer Frequenz von 2 Hz mit einer von der Probandin gerade noch tolerierbaren Spannung. Blutentnahmen erfolgten in der Ruhephase und der ersten Stunde nach Medikamentenapplikation jeweils viertelstündlich, in der zweiten Versuchsstunde in halbstündigen Abständen. Das Mikrodialysat wurde in 10-minütigen Abständen gesammelt. Lediglich in den ersten zwanzig Minuten nach Placebo-/Verumapplikation wurde das Sammelintervall auf fünf Minuten verkürzt, um akute Veränderungen besser quantifizieren zu können.

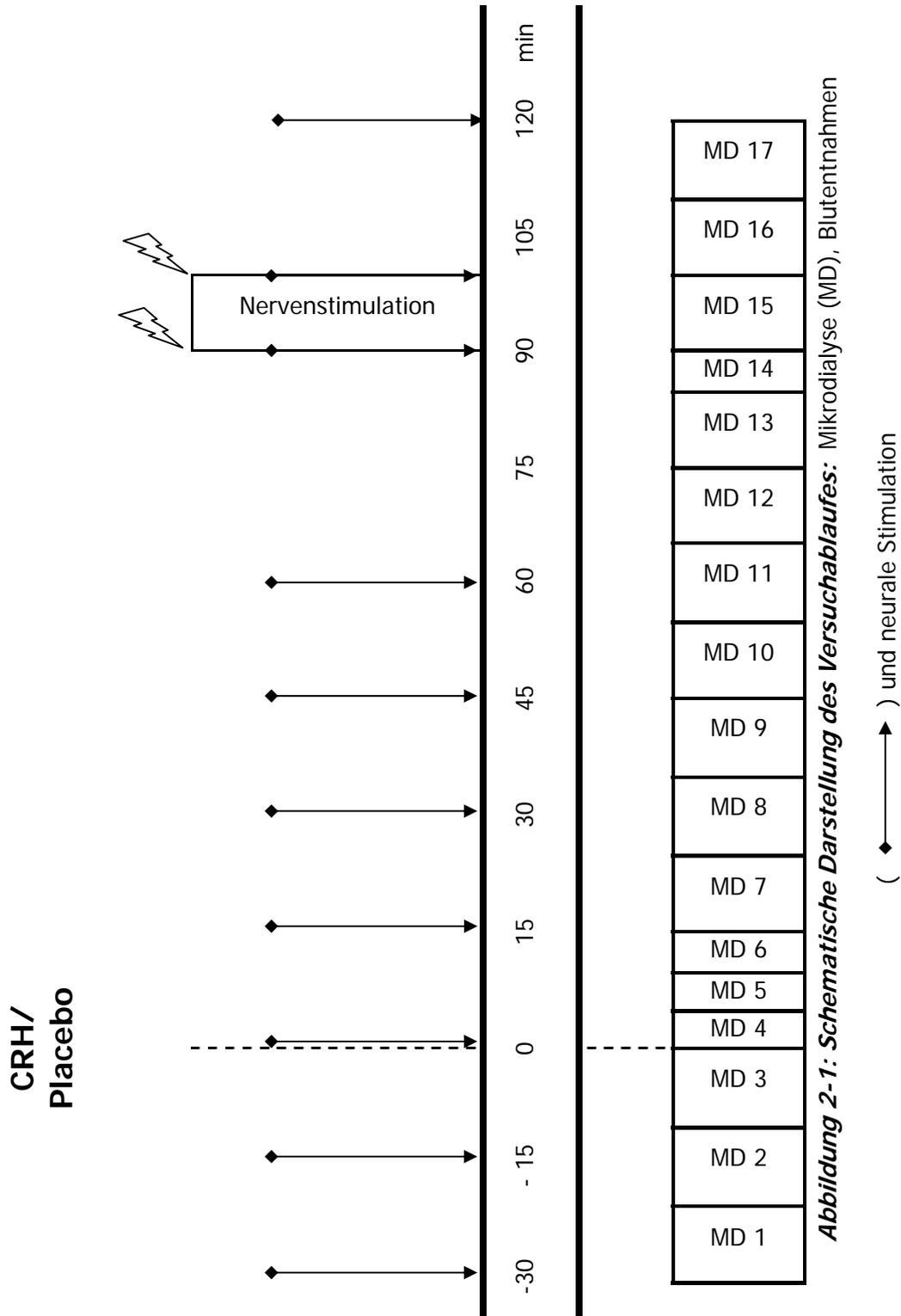


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des Versuchablaufes: Mikroanalyse (MD), Blutentnahmen

2.3 LASER DOPPLER FLOWMETRIE ZUR BESTIMMUNG DES SUBKUTANEN BLUTFLUSSES

2.3.1 ALLGEMEINE GRUNDLAGEN

Die Laser Doppler Flowmetrie (LDF), stellt eine nicht-invasive Möglichkeit zur Messung der kapillären Perfusion dar. Sie kam erstmals 1977 zur klinischen Anwendung (43). Ein über eine Faseroptik applizierter Laserstrahl niedriger Energie wird im Zielgewebe gebrochen und absorbiert. Beim Auftreffen auf sich bewegende Blutkörperchen wird der Strahl teilweise reflektiert und gemäß des Doppler-Prinzips in seiner Frequenz verändert (s. Abbildung 2-2). Dabei ist die Frequenzänderung proportional zur Geschwindigkeit. Die reflektierten Strahlen können über einen optischen Detektor aufgenommen und in ein elektronisches Signal umgewandelt und analysiert werden.

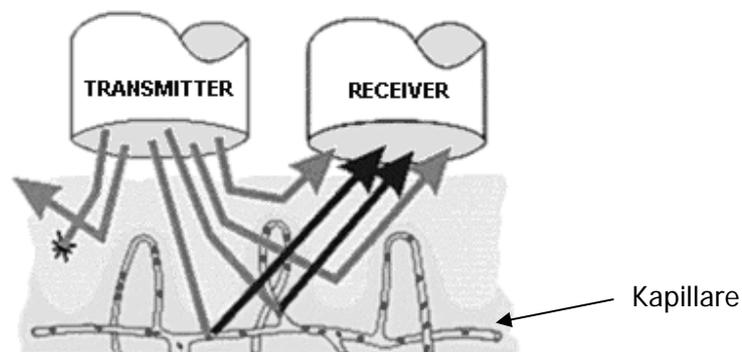


Abbildung 2-2: schematische Darstellung des Laser-Doppler-Prinzips. Erläuterung s. Text

Die Einheit der so erhaltenen Werte wird in willkürlich festgelegten Perfusion Units (PU) angegeben. Um vergleichbare Werte zu erhalten, wird die Sonde in einer speziellen Eichlösung gegen die Braun'sche Molekularbewegung kalibriert.

Die LDF bietet mehrere Vorteile gegenüber anderen Methoden. Sie ist sehr einfach in der Handhabung und sowohl nicht-invasiv, durch auf die Haut geklebte Sonden, als

auch minimal-invasiv, durch in das Fettgewebe eingebrachte Sonden, einsetzbar. Die Messung der mikrovaskulären Perfusion erfolgt hierbei in Echt-Zeit.

Für die Messung des cutanen und subkutanen Blutflusses ist die LDF in einer kürzlich durchgeführten Studie an normal- und übergewichtigen Probandinnen validiert worden. Physiologische Stimuli der sympathischen Nervenaktivität können demnach zuverlässig reproduzierbar detektiert werden (44). Die LDF wird heute zunehmend auch in unterschiedlichen klinischen Bereichen verwendet, insbesondere in der plastischen Chirurgie und der Dermatologie zur Beurteilung der Durchblutung transplantierten Gewebes (45).

2.3.2 DURCHFÜHRUNG DER LDF

In den durchgeführten Versuchen wurde sowohl die Mikroperfusion der Haut als auch des weißen Fettgewebes im seitlichen Oberschenkels untersucht. Für die Messung der Hautdurchblutung wurde eine LDF-Sonde auf das zu untersuchende Areal aufgeklebt (Probe 407-1 [small straight probe], Perimed, Järfälla, Schweden). Die LDF-Sonde im subkutanen Fettgewebe (Probe 402 [needle probe], Perimed, Järfälla, Schweden) wurde mit Hilfe eines Venenverweilkatheters (Venflon™ 0.8/25 mm) in einem 45°-Winkel ca. 1 cm neben der Spitze des Mikrodialyse-Katheters eingebracht. Die Online-Aufzeichnung erfolgte mit Hilfe eines Personal Computers und der Powerlab® - Software (ADInstruments, Spechbach, Deutschland) mit einer Sampling-Rate von 100/s. Zur Auswertung der Daten wurde die Chart5-Software (ADInstruments, Spechbach, Deutschland) verwendet.

2.4 DIE MIKRONEUROGRAPHIE

2.4.1 ALLGEMEINE GRUNDLAGEN

1967 veröffentlichten Hagbarth und Vallbo eine Methode zur *in vivo*-Ableitung der Nervenaktivität beim Menschen mittels perkutan eingebrachter Elektroden, die Mikroneurographie (46). Seitdem wurde diese Methode weiter entwickelt und diente zur Erforschung der proprio- und nozizeptiven Impulse sowie der efferenten

sympathischen Nervenaktivität (47-51). Mit der Mikroneurographie ist es möglich, Potentialänderungen einzelner oder mehrerer Nervenfasern in einem oberflächlich gelegenen peripheren Nerven, wie z.B. dem N. medianus, N. peroneus superficialis oder dem N. cutaneus femoris lat., gegen eine Referenzelektrode abzuleiten. Gemessen werden so genannte Bursts, die durch die zeitgleiche Entladung der Neurone entstehen.

Bei der Ableitung der efferenten sympathischen Nervenaktivität sind zwei unterschiedliche Typen zu unterscheiden: Die muskuläre sympathische Nervenaktivität (MSA) und die sympathische Aktivität der Haut (SSA: Skin sympathetic activity). Die MSA vermittelt hauptsächlich die Kontraktion der Gefäßmuskulatur und dient somit der Regulation des peripheren Widerstandes (52). Das Burstmuster ist typischerweise pulssynchron. Dagegen ist das Burstmuster bei der SSA nicht pulssynchron. Eine Zunahme der Burstfrequenz oder –amplitude führt zu Änderungen des elektrischen Hautwiderstandes, des vaskulären Widerstandes und des Blutdrucks, was auf eine Mischung aus sudomotorischen und vasokonstriktorisches, aber auch vasodilatatorischen Impulsen hindeutet (53-55). Abbildung 2-3 zeigt eine typische Ableitung der SSA.

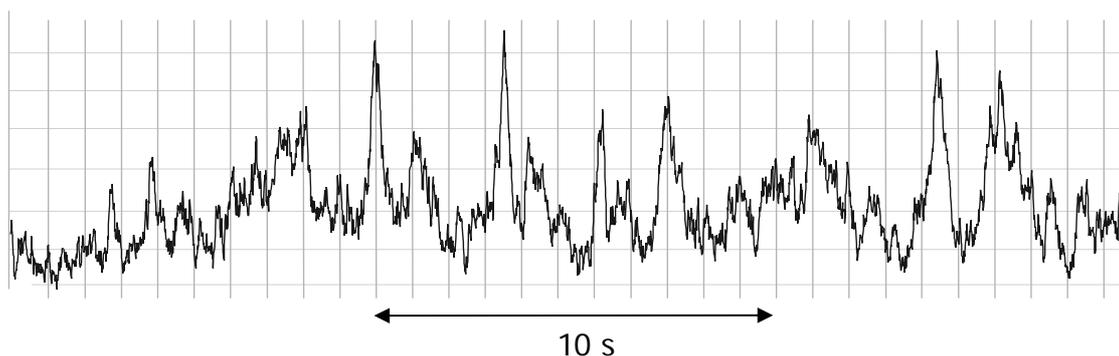


Abbildung 2-3: Ableitung der sympathischen Aktivität in der Haut (SSA) in mV über 30 Sekunden. Ausgehend von der Baseline, entladen sich auf einen sympathiko-exzitatorischen Reiz hin (linke Pfeilspitze) mehrere Summenpotentiale (Bursts).

2.4.2 TECHNISCHE GRUNDLAGEN

Zur Ableitung des Signals werden isolierte Wolframdrähte mit einem Durchmesser von 0,2 mm verwendet. Die zwischen 1 und 15 μm messende Spitze dieser Elektroden ist zur Isolierung mit Epoxidharz überzogen (Voltalac 435). Beim Einführen der Elektrode wird der Isolationslack zurück geschoben und gibt die Spitze frei. Das gegen eine Referenzelektrode abgeleitete Signal wird insgesamt 50 000fach verstärkt und zusätzlich gefiltert und integriert. So können Summenpotentiale mehrerer sympathischer C-Fasern akustisch und visuell dargestellt werden.

2.4.3 DURCHFÜHRUNG DER PUNKTION

Vor der Punktion des Nerven wird eine Referenzelektrode ca. 5 cm von der erwarteten Punktionsstelle entfernt in die Subkutis eingebracht. Anschließend wird der Nervus cutaneus femoris lat. kaudal des Leistenbandes, am Übergang vom medialen zum lateralen Drittel einer gedachten Linie zwischen Spina iliaca ant. sup. und Symphyse, transkutan mit einer Spannung von 20-50 mV stimuliert und mit einem wasserfesten Stift in seinem Verlauf markiert. Danach wird eine Elektrode unter dauerhafter Stimulation mit einer Spannung von 2-5 mV und einer Frequenz von 2 Hz manuell in den Nerven vorgeschoben. Dabei verspürt die Probandin rhythmische Parästhesien im innervierten Areal, die entsprechend der Anzahl der gereizten Fasern zu- oder abnehmen. Am Punkt der stärksten Reizung wird dann versucht, die sympathische Nervenaktivität abzuleiten. Häufig sind kleinere Korrekturen der Elektrodenplatzierung vorzunehmen, bis das Signal in der gewünschten Intensität abgeleitet werden kann. Zu erkennen ist die SSA an ihren charakteristischen, nicht pulssynchronen Bursts (50), die auch durch arithmetischen Stress oder einfaches Erschrecken evoziert werden können. Nach Auffinden der Ableitungsposition sollte die Probandin möglichst ruhig liegen, da auch geringfügige Dislokationen der Elektrode zu einem Verlust des Signals führen können.

2.5 MIKRODIALYSE ZUR BESTIMMUNG DES SUBKUTANEN FETTGEWESMETABOLISMUS

2.5.1 ALLGEMEINE GRUNDLAGEN UND DURCHFÜHRUNG

Die ersten einfachen Verfahren zur Mikrodialyse wurden bereits in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts als so genannte „Push-Pull-Methode“ eingesetzt (56). 1974 beschrieben Ungerstedt und Pycock den Gebrauch von „Hohlfasern“, um den interstitiellen Stoffwechsel zu bestimmen (57). Eine konsequente Weiterentwicklung führte zur heute bekannten Mikrodialyse.

Anfangs wurde die Mikrodialyse zur intrakraniellen Messung von Neurotransmittern bei Ratten eingesetzt (57;58), später wurde sie auch zur Untersuchung anderer Gewebe verwendet. 1987 erfolgte die erste Anwendung im subkutanen Fettgewebe beim Menschen (59). In vielen Studien ist sie seitdem als wissenschaftliche Methode etabliert worden (58-61). Die Hauptanwendung findet die Mikrodialyse heute im subkutanen Fettgewebe, in der Skelettmuskulatur und im ZNS. Aber auch andere Gewebe wie Herzmuskulatur oder Lunge werden mit dieser Technik untersucht.

Das Prinzip der Mikrodialyse basiert, wie auch bei der im klinischen Alltag eingesetzten „Makrodialyse“, auf einem Stoffaustausch zwischen zwei Flüssigkeiten unterschiedlicher Stoffkonzentration entlang einer semi-permeablen Membran. An der Spitze des Dialysekatheters befindet sich diese Membran mit definierter Länge und Porengröße, so dass nur Moleküle bestimmten Durchmessers hindurch diffundieren können (vgl. Abbildung 2-4).

In den durchgeführten Experimenten wurde ein Katheter mit einer Membranlänge von 30 mm und einem Cut-off von 20 kDalton verwendet.

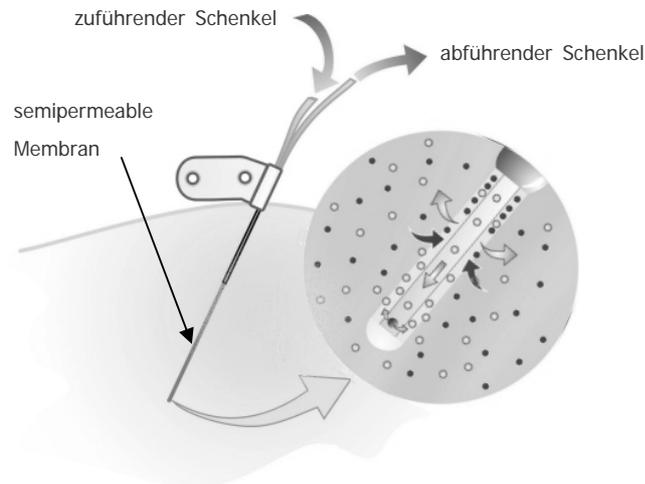


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der Mikrodialyse, modifiziert nach Carnegie Medical, Stockholm, Schweden.

Der Dialysekatheter wird mittels einer Führungsnadel in das subkutane Fettgewebe eingebracht und anschließend kontinuierlich mit einer physiologischen Lösung bekannter Zusammensetzung (z.B. Ringer-Lösung) perfundiert. Über einen abführenden Schenkel kann das Dialysat in speziellen Gefäßen gesammelt werden. Zwischen der Perfusionsflüssigkeit und dem Interstitium kommt es zum bidirektionalen Austausch von Flüssigkeit und kleinen Molekülen entsprechend des Konzentrationsgefälles. Auf Grund dessen ist es prinzipiell auch möglich, pharmakologisch wirksame Substanzen mittels Mikrodialyse in die Subkutis einzubringen.

Bei der Messung von Substanzkonzentrationen im Dialysat ist zu beachten, dass sich nur ein bestimmter Anteil der im Interstitium vorliegenden Konzentration an Stoffen wieder finden lässt (Recovery). Die Recovery ist abhängig von der Membranporengröße, der Membranlänge, der Perfusionsgeschwindigkeit des Dialysats und der Durchblutung des zu untersuchenden Gewebes. Sollen quantitative Konzentrationsbestimmungen vorgenommen werden, so muss zuvor eine Kalibrierung erfolgen. Eine gängige Methode der Kalibrierung wurde von Lönnroth beschrieben (59) und ist insbesondere für selbst konstruierte Dialysemembranen notwendig. Die

von uns verwendeten kommerziellen Microdialysekatheter weisen bei einem Perfusionsfluss von 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$ eine Recovery von nahezu 100% auf. Das für eine Analyse benötigte Dialysatvolumen beträgt mindestens 9 μl . Unter einem Fluss von 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$ wäre eine Messung der Metaboliten nur alle 30 Minuten möglich gewesen. Da ein Ziel der Versuche war kurzfristige Veränderungen von Metaboliten im Fettgewebe zu messen, entschieden wir uns, den Dialysatfluss auf Kosten einer 100%igen Recovery zu erhöhen. Hierdurch war eine Metabolitenbestimmung im Dialysat alle 5 Minuten möglich. Da die Konzentrationen im Dialysat unter den gegebenen Umständen aber nicht mehr denen im Interstitium entsprachen, stellten wir Konzentrationsveränderung als relative Veränderungen im Vergleich zu einem Basalwert dar. Bei einem konstanten - wenn auch hohem - Dialysatfluss kann trotzdem von einem konstant bleibenden Stoffaustausch über der Membran ausgegangen werden (59;61), und Kalibrierung ist nicht erforderlich.

2.6 ANALYTIK DER PROBEN

Bestimmt wurden die ACTH- und Cortisolspiegel im EDTA-Plasma, respektive Serum sowie die Plasma-Konzentrationen von Laktat, Glycerol, Glukose und freien Fettsäuren. Weiterhin erfolgte die Analyse von Laktat, Glukose und Glycerol im Mikrodialysat. Die Auswertung der Blutproben wurde im Doppelansatz unter anschließender Mittelwertbildung durchgeführt. Auf Grund der geringen Proben-Volumina konnte bei der Auswertung des Mikrodialysates nur eine Einfach-Bestimmung durchgeführt werden.

2.6.1 BLUTPROBEN

Die ACTH-Proben wurden direkt nach Entnahme im Eisbad gelagert. Unmittelbar nach Versuchsende wurden die Blutproben abzentrifugiert und bis zur Auswertung bei -80°C tiefgefroren. Die Bestimmung der Plasma-Konzentrationen von Glycerol, Laktat

und Glukose wurde mit dem CMA 600 Microdialysis Analyzer (CMA/Microdialysis AB, Stockholm, Schweden) durchgeführt. Die Analyse basiert auf photometrischer Absorptionsmessung nach vorheriger enzymatischer Oxidation. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0.1 mmol/l für Glukose und Laktat und 0.01 mmol/l für Glycerol. Die freien Fettsäuren wurden enzymatisch mit Acyl-CoA Synthase, Acyl-CoA Oxidase und Peroxidase bestimmt (Roche Cat.No. 11 383 175, free fatty acids, half-micro test). Intra- und Interassay-Varianz liegen bei ca. 5 und 8 % (CV).

2.6.1.1 ACTH, CORTISOL

Die Bestimmung von ACTH erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen sequenziellen immunometrischen Chemilumineszens-Assays (IMMULITE[®] ACTH, GPC, Los Angeles, USA). Die analytische Sensitivität liegt bei 9 pg/ml (2 pmol/l), intra-assay CV < 3,9%, inter-assay CV < 5,1%.

Die Bestimmung von Cortisol erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen kompetitiven Chemilumineszenz-Immunassays (IMMULITE[®] Cortisol, GPC, Los Angeles, USA). Die analytische Sensitivität liegt bei 0,2 µg/dl (5,5 nmol/l), die Inter-Assay-Varianz bei <3,5%

2.6.2 MIKRODIALYSAT

Das Mikrodialysat wurde unmittelbar nach Versuchsende bei -80°C bis zur Untersuchung gelagert. Die Auswertung wurde mit dem CMA 600 Microdialysis Analyzer (CMA/Microdialysis AB, Stockholm, Schweden) durchgeführt. Die Analyse basiert auf photometrischer Absorptionsmessung nach vorheriger enzymatischer Oxidation. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0.1 mmol/l für Glukose und Laktat sowie 0.01 mmol/l für Glycerol.

2.6.3 STATISTIK

Die statistische Auswertung erfolgte in zwei Schritten. Zuerst mittels einer ANOVA (analysis of variance) mit dem Faktor „Behandlung (Placebo/Verum)“ und dem Messwiederholungsfaktor „Zeit“ über sämtliche Messwerte. Stellten sich in dieser Analyse signifikante Unterschiede dar, wurde eine post-hoc Analyse der Einzelwerte bezüglich des Behandlungseffektes (Placebo versus CRH) angeschlossen. Ein nach Greenhouse-Geisser korrigierter p-Wert von 0,05 wurde als Signifikanzniveau festgelegt. Alle Daten werden als Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean) angegeben.

3 ERGEBNISSE

3.1 SYMPATHISCHE NERVENAKTIVITÄT

Die Ableitung der sympathischen Nervenaktivität gestaltete sich schwierig. Ausgewertet wurden die Ableitungen von 10 Versuchen (7 Verum und 3 Placebo) in denen ein konstantes Signal abgeleitet werden konnte. In 9 Versuchen ließ sich nur ein unzureichendes Signal ableiten, in weiteren 5 Versuchen kam es nach anfänglich guten Ableitungen zu einer Abschwächung des Signals bzw. zu einer Elektrodendislokation.

In den verwertbaren Ableitungen besteht der Eindruck einer Zunahme der Burstfrequenz in der Verum-Gruppe (Abbildung 3-1). Im Gegensatz dazu veränderte sich die Burstfrequenz in der Placebo-Gruppe scheinbar nicht. Auf Grund der kleinen Stichproben wurde allerdings keine ANOVA berechnet.

Ein Vergleich zwischen der Reaktion auf eine morgendliche oder nachmittägliche CRH-Gabe ergab keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

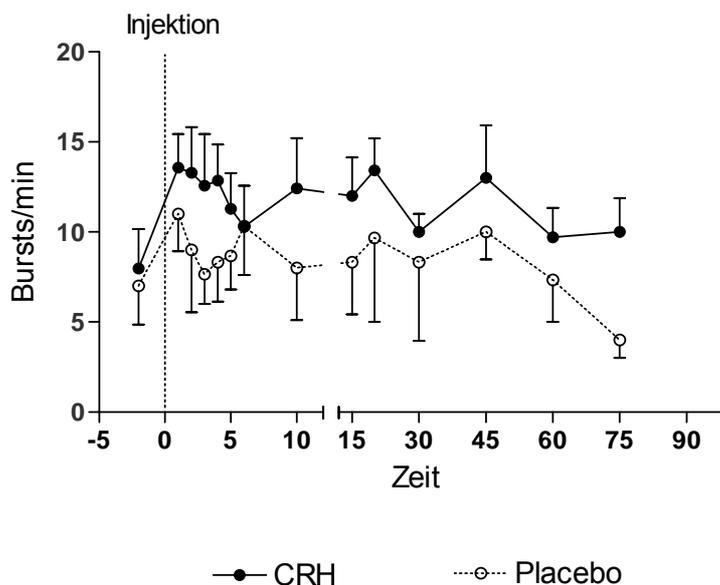


Abbildung 3-1: SSA dargestellt als Burstfrequenz (bursts/min) vor und nach Injektion von Placebo- (n=3) oder CRH (n=7).

3.2 MIKRODIALYSE

3.2.1 GLYCEROL

Im Vergleich zu Placebo bewirkte CRH eine signifikante Erhöhung der interstitiellen Glycerol-Konzentration mit einem Maximum nach 15 Minuten ($19.0 \pm 5.4 \%$, $p < 0.05$). 55 Minuten nach der CRH-Applikation war das Glycerol wieder auf den Basalwert zurück gefallen (s. Abbildung 3-2).

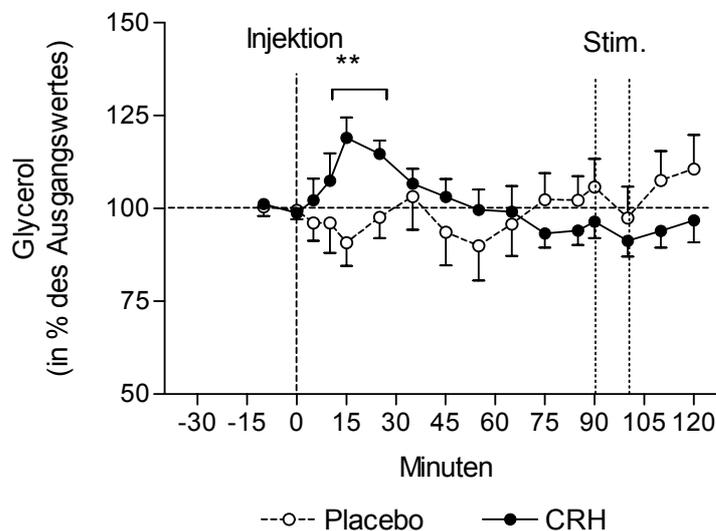


Abbildung 3-2: Interstitielle Glycerol-Konzentrationen im subkutanen Fettgewebe des lateralen Oberschenkels vor und nach CRH-/Placebo-Gabe. ** $p < 0.05$, Mittelwerte \pm SEM, $n = 12$

3.2.2 LAKTAT

Nach der CRH-Gabe zeigte sich eine signifikante Erhöhung der interstitiellen Laktat-Konzentration mit einem Maximum nach 15 Minuten ($20.2 \pm 5.8 \%$, $p < 0.001$). Bereits 30 Minuten nach der CRH-Applikation war das Laktat wieder auf das Ausgangsniveau zurück gefallen (s. Abbildung 3-3). Placebo hatte keinen Einfluss auf die interstitiellen Laktat-Spiegel.

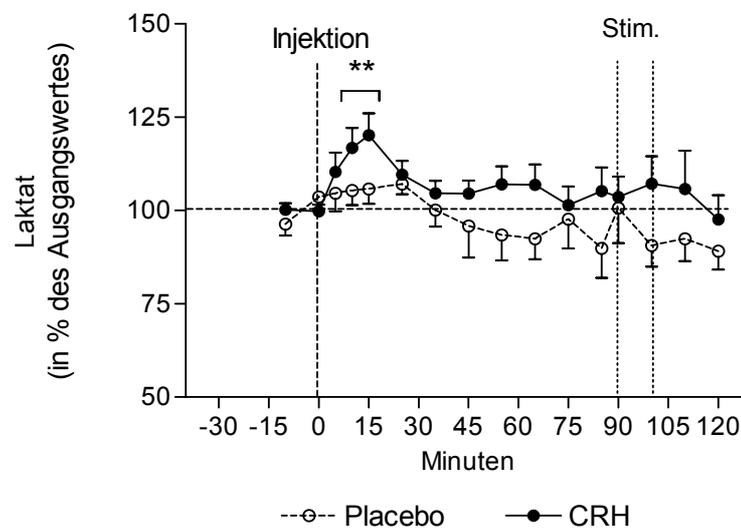


Abbildung 3-3: Interstitielle Laktat-Konzentrationen im subkutanen Fettgewebe des lateralen Oberschenkels vor und nach CRH-/Placebo-Gabe. ** $p < 0.001$, Mittelwerte \pm SEM, $n = 12$

3.2.3 GLUKOSE

Unter Basalbedingungen unterschieden sich Placebo- und Verum-Gruppe nicht von einander. Die CRH-Gabe führte zu einem biphasischen signifikanten Anstieg der interstitiellen Glukose-Konzentration. Das erste Maximum wurde nach 15 Minuten erreicht ($13.5 \pm 5.8 \%$, $p < 0.05$), anschließend kam es zu einem raschen Abfall auf

Ausgangswerte. 45 Minuten nach der CRH-Applikation kam es zu einem erneuten, kontinuierlichen Anstieg der interstitiellen Glukose-Konzentration, der sein Maximum nach 90 Minuten erreichte ($34.2 \% \pm 7.7$, $p < 0.001$, s. Abbildung 3-4). Im Vergleich dazu bewirkte Placebo keine signifikante Änderung der interstitiellen Glukose-Konzentration.

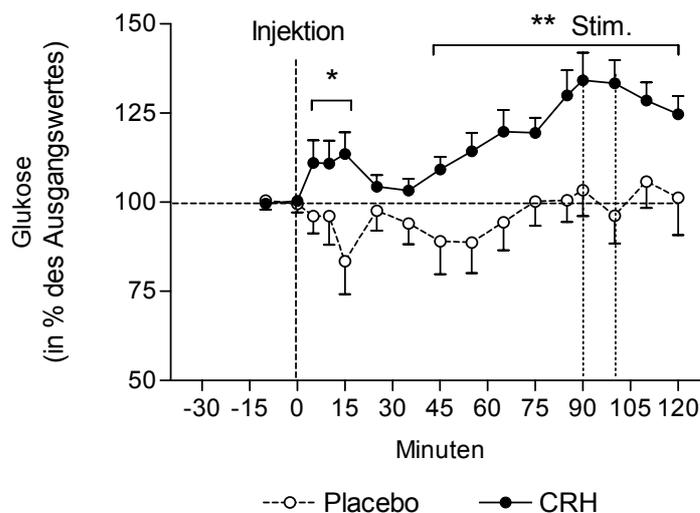


Abbildung 3-4: Interstitielle Glukose-Konzentrationen im subkutanen Fettgewebe des lateralen Oberschenkels vor und nach CRH-/Placebo-Gabe. * $P > 0.05$, ** $p < 0.001$, Mittelwerte \pm SEM, $n = 12$

3.3 PLASMA- UND SERUMKONZENTRATIONEN

3.3.1 GLYCEROL

Unter Basalbedingungen unterschieden sich die Placebo- und Verum-Gruppe nicht. Die CRH-Gabe führte zu einer signifikanten Erhöhung der Plasma-Glycerol-Konzentration mit einem Maximum nach 15 Minuten ($16.7 \pm 5.9 \%$, $p < 0.05$). Im Gegensatz zur interstitiellen Glycerol-Konzentration hielt der Anstieg länger an und

erreichte das Ausgangsniveau nach 60 Minuten. Placebo bewirkte keine Änderung der Glycerol-Spiegel (s. Abbildung 3-5).

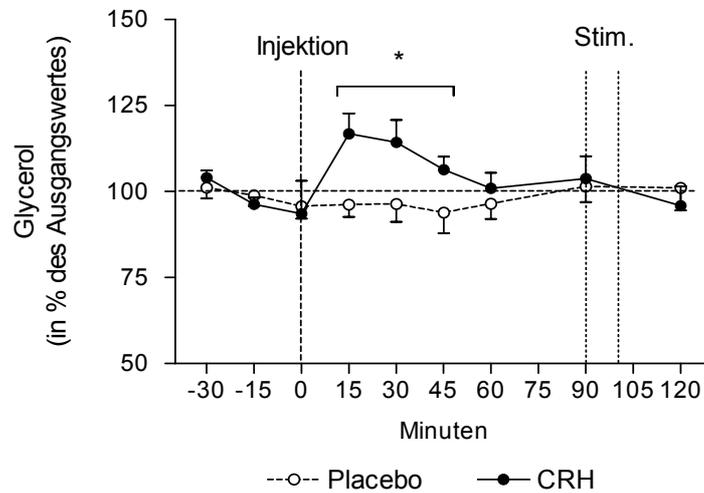


Abbildung 3-5: Plasma-Glycerol-Konzentrationen vor und nach CRH-Gabe. Mittelwerte \pm SEM, n = 12, * p < 0.05.

3.3.2 LAKTAT

Weder die CRH- noch die Placebo-Gabe führte zu einer signifikanten Änderung der Plasma-Laktat-Spiegel. Ein leichter Laktatabfall nach CRH-Gabe erreichte das Signifikanzniveau nicht (s. Abbildung 3-6).

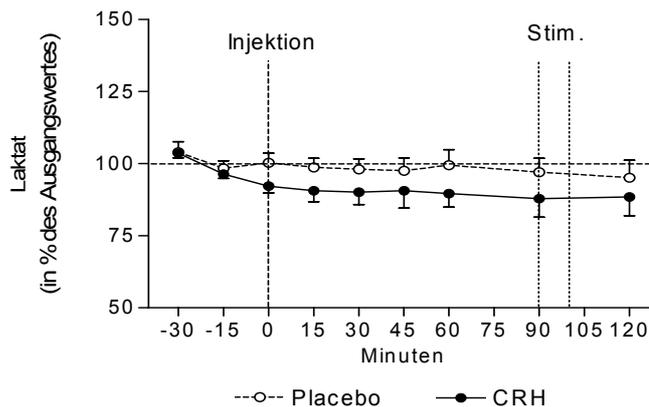


Abbildung 3-6: Plasma-Laktat-Konzentrationen vor und nach Verum-/Placebo-Gabe, Mittelwerte \pm SEM, n = 12

3.3.3 GLUKOSE

Weder die CRH- noch die Placebo-Gabe führte zu einer signifikanten Änderung der Plasma-Glukose-Spiegel (Abbildung 3-7).

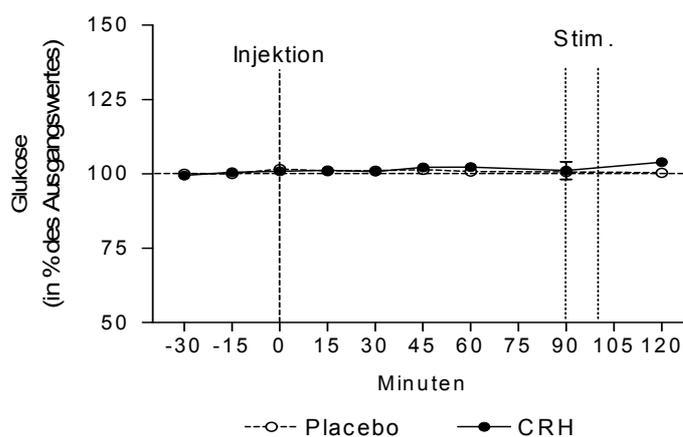


Abbildung 3-7: Plasma-Glukose-Konzentrationen vor und nach Verum-/Placebo-Gabe, Mittelwerte \pm SEM, n = 12

3.3.4 FREIE FETTSÄUREN

CRH bewirkte eine signifikante Erhöhung der FFA im Plasma mit einem Maximum nach 30 Minuten ($15.6 \pm 4.6 \%$, $p < 0.05$). 60 Minuten nach der CRH-Injektion hatten sich die FFA wieder normalisiert. Placebo bewirkte keine Veränderung der FFA im Plasma (s. Abbildung 3-8).

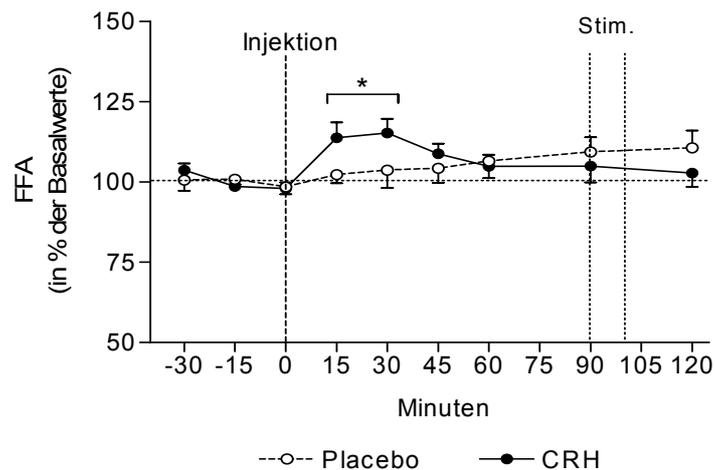


Abbildung 3-8: Plasma-Konzentrationen der freien Fettsäuren (FFA) vor und nach intravenöser CRH-Gabe gegenüber Placebo. Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0.05$, $n = 12$.

3.3.5 ACTH

Nach der CRH-Gabe kam es erwartungsgemäß zu einem signifikanten Anstieg des Plasma-ACTH von $1.8 \pm 0,2$ pmol/l (8.1 ± 0.9 pg/ml) auf ein Maximum von 7.9 ± 0.8 pmol/l (35.59 ± 3.6 pg/ml) nach 45 Minuten ($p < 0.01$). Danach fiel der Plasma-Spiegel sukzessive bis auf Normalwerte am Ende des Versuchs ab. Die Placebo-Injektion hatte keinen signifikanten Einfluss auf die ACTH-Spiegel.

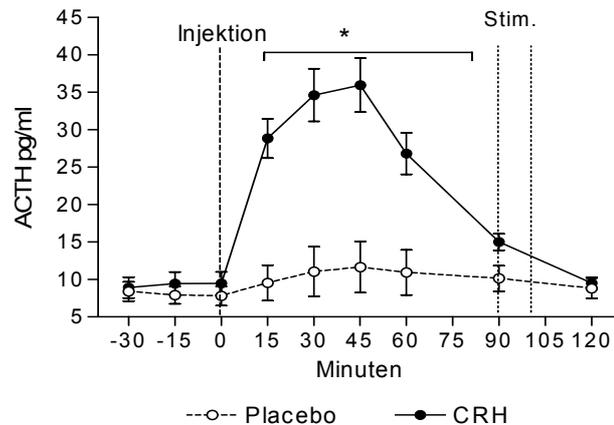


Abbildung 3-9: Plasma-ACTH-Spiegel vor und nach Placebo-/CRH-Gabe. * $p < 0.001$, Mittelwerte \pm SEM, $n = 12$

3.3.6 CORTISOL

Auch die Serum-Cortisol-Spiegel stiegen nach der CRH-Gabe erwartungsgemäß signifikant an. Ausgehend von einem Basalwert von 211 ± 25.3 nmol/l (7.64 ± 0.92 $\mu\text{g/dl}$) wurde nach 45 Minuten ein Maximum von 526.9 ± 27.9 nmol/l (19.09 ± 1.01 $\mu\text{g/dl}$) erreicht ($p < 0.01$). Nach 60 Minuten fiel der Serum-Spiegel kontinuierlich ab. Am Ende des Versuches waren noch leicht erhöhte Cortisol-Spiegel messbar. Placebo bewirkte keine Änderung des Serum-Cortisol.

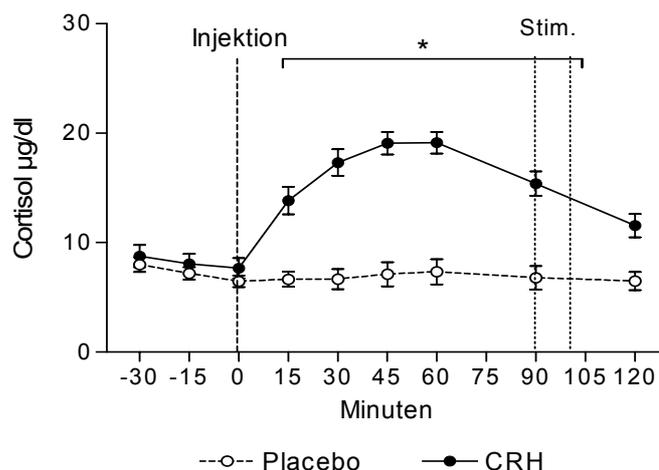


Abbildung 3-10: Serum-Cortisol-Spiegel vor und nach Placebo-/CRH-Gabe. * $p < 0.001$, Mittelwerte \pm SEM, $n = 12$

3.4 GEWEBSPERFUSION

3.4.1 HAUTPERFUSION

Die Placebo-Injektion führte zu keiner Veränderung der Hautperfusion. Dagegen nahm nach der CRH-Gabe die Perfusion rasch signifikant zu und erreichte nach 3 Minuten ein Maximum ($43.83 \pm 11.2\%$, $p < 0.01$). Im Folgenden fiel die Perfusion allmählich auf ein nicht signifikantes Niveau (ab siebte Minute nach Injektion) ab, blieb jedoch, im Gegensatz zu Placebo, während der gesamten verbleibenden Versuchsdauer leicht erhöht. Die Zunahme der Hautperfusion zeigte sich auch klinisch in Form einer kurz auftretenden Flush-Symptomatik bei 10 Probandinnen.

Die direkte nervale Reizung bewirkte in beiden Gruppen zunächst eine leichte Reduktion der Perfusion. Nach Beendigung der Stimulation stieg der cutane Blutfluss kurzzeitig, jedoch nicht signifikant an. Als Bezugswerte wurden jeweils die zwei vorausgehenden Messwerte angenommen.

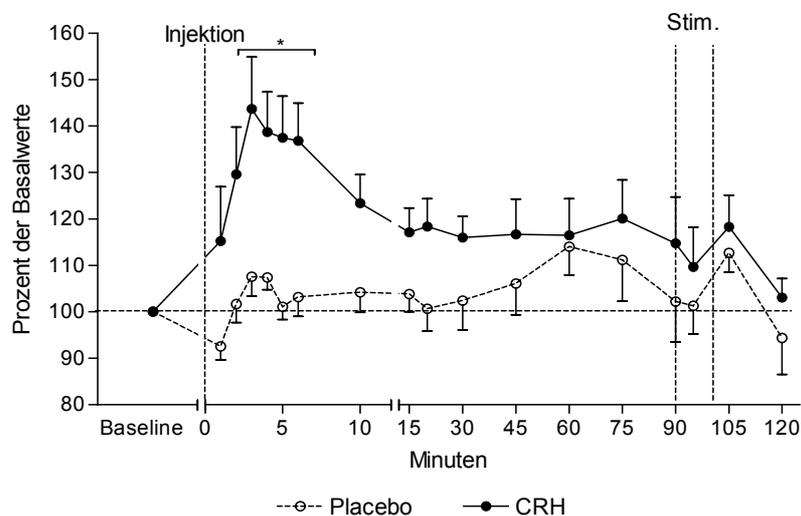


Abbildung 3-11: Hautperfusion vor und nach Verum-/Placebo-Gabe. * $p < 0.01$, Mittelwerte \pm SEM, $n = 12$

3.4.2 SUBKUTANE PERFUSION

Weder die Placebo-, noch die CRH-Gabe führte zu einer signifikanten Änderungen der Perfusion des subkutanen Fettgewebes. Auffällig ist ein kontinuierlicher Anstieg des subkutanen Blutflusses bis zum Versuchsende in beiden Gruppen sowie die relativ starke interindividuelle Schwankungsbreite in den Werten, insbesondere in der zweiten Beobachtungshälfte.

Die Stimulation des N. cutaneus femoris lat. gegen Ende des Versuches erbrachte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der Fettgewebsperfusion. Als Bezugswerte wurden jeweils die zwei vorausgehenden Werte angenommen.

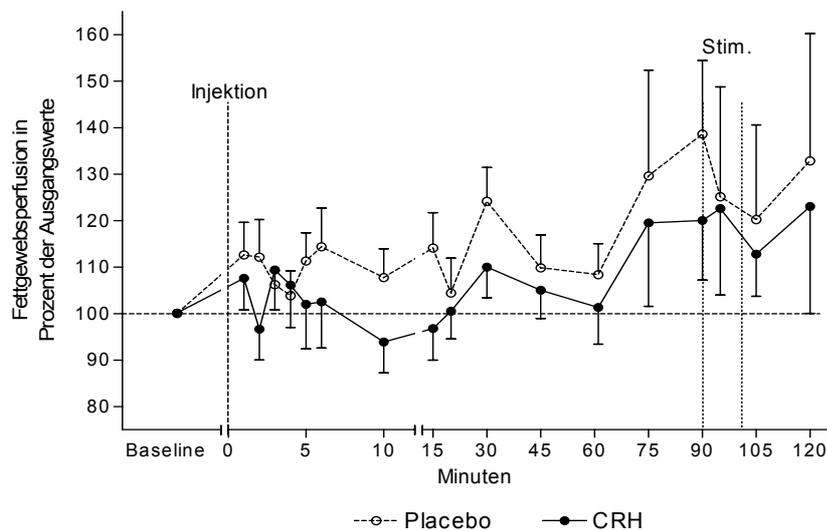


Abbildung 3-12: Fettgewebsperfusion vor und nach Verum-/Placebo-Gabe.

Mittelwerte ± SEM, n = 12

3.5 VITALPARAMETER

3.5.1 HERZFREQUENZ

Die Herzfrequenzen während der Ruhephase unterschieden sich zwischen der Placebo- und Verumgruppe nicht (66.1 ± 3.1 vs. 65.9 ± 3.2 Schläge/min). Die CRH-Gabe führte zu einer raschen, signifikanten Zunahme der Herzfrequenz mit einem Maximum nach 3 Minuten (84.2 ± 4.1 Schläge/min, entsprechend $+28.08 \pm 2.98\%$, $p < 0.001$), die dann sukzessive abfiel. Nach 15 Minuten zeigten sich zwischen den Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede mehr. Die Placebo-Injektion führte zu keinen Veränderungen.

Durch die direkte Nervenstimulation kam es zu einer geringfügigen, nicht signifikanten Zunahme der Herzfrequenz ($t=90-100$). Als Bezugswerte wurden jeweils die zwei vorausgehenden Werte angenommen.

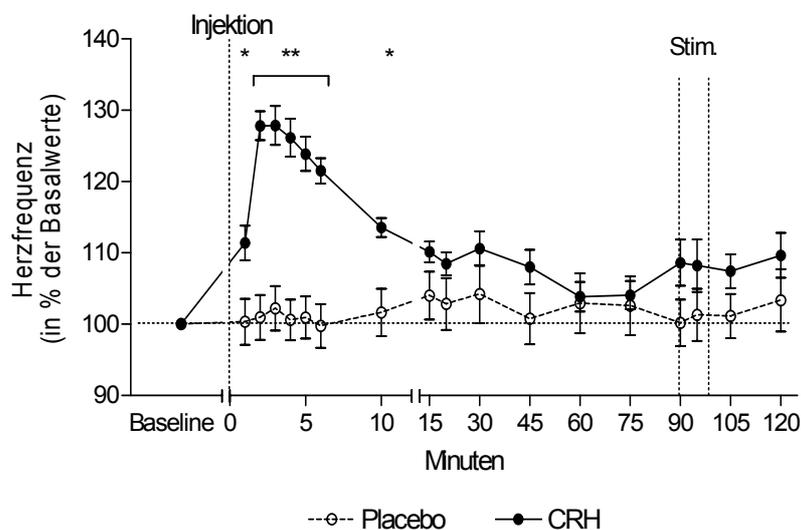


Abbildung 3-13: Herzfrequenz vor und nach Placebo-/CRH-Gabe. Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0.01$, ** $p > 0.001$, $n=12$.

3.5.2 BLUTDRUCK

Ausgehend von einem diastolischen Blutdruck von 80.2 ± 2.6 mmHg kam es unmittelbar nach der CRH-Gabe zu einem signifikanten Abfall auf minimal 73.08 ± 2.28 mmHg ($t=2$ Minuten [$p < 0.05$]). Dieser hielt ca. 4 Minuten an. Der systolische Blutdruck blieb in diesem Zeitraum dagegen unverändert. In der zweiten Beobachtungshälfte waren sowohl der systolische als auch der diastolische Blutdruck geringfügig, jedoch nicht signifikant, erhöht. Placebo bewirkte keine signifikante Änderung des systolischen oder diastolischen Blutdrucks.

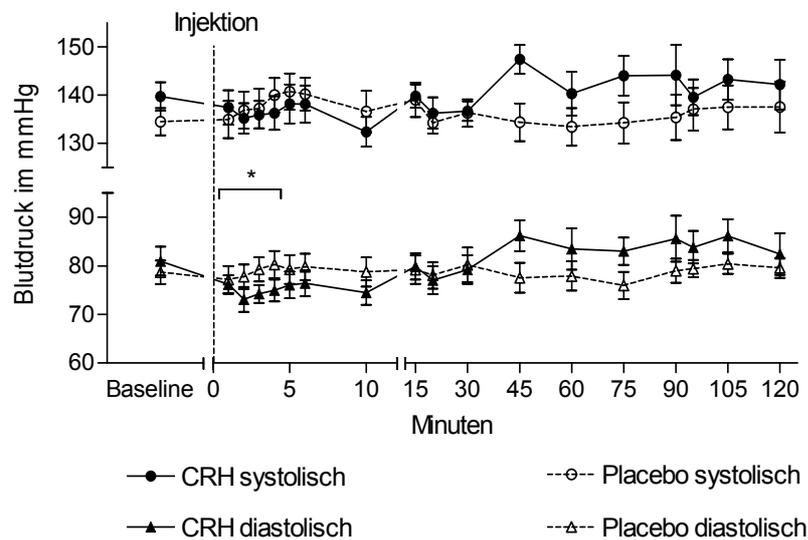


Abbildung 3-14: Systolischer und diastolischer Blutdruck in mmHg vor und nach Placebo/CRH, Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0.05$, $n=12$.

4 DISKUSSION

Im Bereich des lateralen Oberschenkels junger Frauen führte die intravenöse Injektion von CRH sowohl zur Veränderung der Hautperfusion, als auch zu deutlichen metabolischen Veränderungen im subkutanen Fettgewebe. Die Durchblutung des Unterhautfettgewebes wurde dagegen nicht beeinflusst.

4.1 CRH-EFFEKTE AUF DIE PERFUSION VON HAUT UND UNTERHAUTFETTGEWEBE

In der vorliegenden Studie wurde die Perfusion der Haut und des Unterhautfettgewebes mittels LDF untersucht. Diese wurde für die vorliegende Fragestellung in einer voraus gehenden Studie unter verschiedenen sympathoexzitatorischen Manövern validiert (43;44). Als Alternative käme die ¹³³Xenon-Auswasch Methode in Frage, die 1966 von Larsen et al. (62) beschrieben wurde. Diese Methode bedient sich des radioaktiven γ -Strahlers ¹³³Xenon, der in das zu untersuchende Areal appliziert wird. In Deutschland ist dieses Verfahren auf Grund der radioaktiven Strahlenbelastung bei Versuchen mit gesunden Probanden nicht zugelassen. Vergleichende Untersuchung der ¹³³Xe Auswasch-Methode mit der LDF zeigen eine gute Korrelation beider Methoden während länger andauernden Perfusionsveränderungen (44). Darüber hinaus können trotz des hohen technischen Aufwands bei der ¹³³Xenon-Auswasch Methode feine Unterschiede oder nur kurz anhaltende Veränderungen in der Mikrozirkulation nicht oder nur schlecht erfasst werden. Zudem lässt die ¹³³Xenon-Auswasch Methode keine exakte Aussage darüber zu, in welcher Hautschicht die Änderung der Perfusion auftritt. Eine getrennte Betrachtung der Perfusion von Subkutis und Epidermis ist entsprechend nicht möglich.

Die CRH-Injektion erhöhte die Hautperfusion rapide für ca. 7 min. Dies wurde von einem Großteil der Probandinnen als Flush-Symptomatik bemerkt (n= 10), die als eine unerwünschte Nebenwirkung bei dem in der Klinik angewandten CRH-Test seit

langem bekannt ist. Mit der Zunahme der Hautdurchblutung ging eine deutliche Herzfrequenzbeschleunigung einher, während der Blutdruck im Wesentlichen unbeeinflusst blieb. Dies könnte darauf hinweisen, dass als Antwort auf die Hautgefäßerweiterung eine Aktivierung des sympathischen kardiovaskulären Systems stattfindet, die den Blutdruck konstant hält. Interessanterweise war eine der Hautdurchblutung parallele Steigerung der Fettgewebsperfusion nicht zu beobachten. Dies bestätigt Untersuchungen unserer eigenen Arbeitsgruppe, die kürzlich zeigen konnte, dass die Durchblutungen von Haut und Unterhautfettgewebe differentiell reguliert werden (44). Crompton et al (36) konnten zeigen, dass eine CRH-induzierte Vasodilatation durch Histaminliberatoren an den Mastzellen der Epidermis bewirkt wird. Diese finden sich weniger im Unterhautfettgewebe, so dass es plausibel erscheint, dass der Perfusionseffekt durch CRH auf die Haut beschränkt bleibt.

Der fehlende Effekt von CRH auf die Fettgewebsdurchblutung ist für die Interpretation der Mikrodialyseergebnisse relevant, da der Stofftransport über die Mikrodialysemembran von der Gewebepfusion abhängt. Eine erhöhte Perfusion bedingt einen verstärkten Stoffabtransport durch das Gefäßsystem. Dies bewirkt ein Abfall der Metabolite im Mikrodialysat, ohne dass der sich Stoffwechsel im zu untersuchenden Gewebe geändert hat. Umgekehrt bewirken eine Vasokonstriktion und eine Abnahme der Gewebsperfusion einen Anstieg der Metabolite im Mikrodialysat. Weiterhin kann die Perfusionsgeschwindigkeit der Mikrodialyse die interstitielle Clearance beeinflussen. Diese blieb jedoch während der gesamten Versuchszeit konstant bei 2.5 µl/min und ist somit zu vernachlässigen.

In der vorliegenden Studie zeigte sich keine Abnahme der Gewebsperfusion, allenfalls eine geringe Zunahme, die aber bei der gegebenen Probandinnenzahl keine Signifikanz erreicht. Dies bedeutet, dass der Anstieg der Konzentration verschiedener Metabolite im Mikrodialysat eindeutig metabolischen Effekten des Peptids im subkutanen Gewebe zuzuordnen und keine indirekte Folge von Durchblutungsänderungen ist.

4.2 GLYCEROL UND FREIE FETTSÄUREN

Im Unterschied zu Placebo erhöhte intravenös appliziertes CRH in den durchgeführten Versuchen unmittelbar die Glycerol-Konzentrationen im Interstitium und Plasma mit einem Maximum nach jeweils 15 Minuten. Zeitgleich stiegen die FFA im Plasma auf ein Maximum nach 30 Minuten an. Die Anstiege hielten etwa gleich lang an und erreichten Basalwerte nach 55 (Interstitium), respektive 60 Minuten (Plasma).

Glycerol und freie Fettsäuren entstehen durch die Spaltung von Triglyceriden. Die FFA werden relativ schnell über eine β -Oxidation abgebaut. Im Gegensatz dazu wird Glycerol langsamer metabolisiert und ist daher ein sehr guter Marker für eine Lipolyse im Fettgewebe (63). Da die Konzentrationen im Interstitium und Plasma hierbei gut miteinander korrelieren (64), ist ein zeitgleicher Glycerol-Anstieg, wie es in durchgeführten Versuchen der Fall ist, als Ausdruck einer Lipolyse im subkutanen Fettgewebe zu interpretieren. Dies wird durch den annähernd parallelen, signifikanten Anstieg der FFA bekräftigt. Die Mikrodialyse im Interstitium konnte zeigen, dass der Anstieg des Glycerols sofort nach der CRH-Injektion stattfindet, auch, wenn das Signifikanzniveau erst nach 15 Minuten erreicht wird. Dies deutet auf eine direkte CRH-Wirkung hin, die sowohl am Adipozyten als auch über zentralnervöse Mechanismen (z.B. über das sympathische Nervensystem) vermittelt werden könnte. Ein sympathoexzitatorischer Effekt von CRH wurde im Tiermodell beschrieben (33;40). In den vorliegenden Experimenten wurde daher eine Ableitung der sympathischen Nervenaktivität vorgenommen. Der rasche Anstieg der lipolytischen Metabolite in den vorliegenden Versuchen könnte für eine Sympathikus-vermittelte Lipolyse sprechen, allerdings ließen sich in den erfolgreich durchgeführten Ableitungen keine signifikanten Änderungen der Burstrate im Vergleich zur Placebo-Gruppe detektieren. Eine Sympathikus-vermittelten Lipolyse ist entsprechend anzuzweifeln, jedoch ist anzumerken, dass bei einer höheren Fallzahl möglicherweise ein signifikanter Unterschied aufgetreten wäre. Gegen die Hypothese einer CRH-vermittelten Aktivierung des sympathischen Nervensystems beim Menschen spricht

zudem, dass Smith et al. keinen Anstieg der Katecholamine im Plasma nach intravenöser CRH-Gabe nachweisen konnten (29).

Alternativ könnten Peptidhormone, die durch die CRH-Gabe freigesetzt werden, eine Lipolyse auslösen. Dies gilt insbesondere für die Derivate des POMC, die sehr rasch nach einer CRH-Gabe hypophysär sezerniert werden und wie das CRH über membranös lokalisierte Rezeptoren schnell ihre Wirksamkeit entfalten. So ist für das ACTH eine lipolytische Aktivität im Tiermodell nachgewiesen worden. Beim Menschen konnte dieser Effekt bisher allerdings nicht gezeigt werden (21;23). Eine direkte, ACTH-vermittelte Lipolyse muss im vorliegenden Fall entsprechend angezweifelt werden.

Ein weiteres Peptid, das sowohl lipolytische Wirkung besitzt und durch CRH freigesetzt wird, ist β -Lipotropin (β -LPH). Die bislang durchgeführten Studien haben eine β -LPH-vermittelte Lipolyse allerdings nur im Tierversuch oder *in vitro* beschrieben (65;66). In den vorliegenden Versuchen wurde das β -LPH nicht bestimmt. Da das β -LPH jedoch annähernd zeitgleich mit ACTH sezerniert wird (67;68), ist anzunehmen, dass der maximale β -LPH-Spiegel erst erreicht wird, nachdem sich die interstitielle und Serumkonzentration von Glycerol wieder normalisiert haben, was einen Effekt auf die Lipolyse zumindest fraglich erscheinen lässt.

Auch für Cortisol wurde eine lipolytische Potenz beschrieben, die in einem Experiment von Djurhuus et al. bei einer Cortisol-Dauerinfusion beobachtet wurde (69). Dieser Effekt trat allerdings erst nach 210 Minuten auf, was dafür spricht, dass hier Glucokorticoideffekte über die klassischen genomischen Wirkungen vermittelt werden. Im Gegensatz dazu war der Maximalanstieg der lipolytischen Metabolite in den vorliegenden Experimenten bereits nach 15 Minuten zu verzeichnen und hielt bis 55 Minuten nach der CRH-Gabe an. Ein anfänglicher, kurz andauernder Cortisol-Effekt wäre theoretisch denkbar. Dagegen spricht, dass sich in den Versuchen von Djurhuus et al., in denen die Glycerol-Konzentration nach 30 Minuten bestimmt wurde, keine signifikante Änderung zeigte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Lipolyse in den vorliegenden Experimenten am ehesten auf eine direkte CRH-Wirkung an den im Fettgewebe nachgewiesenen CRH-Rezeptoren (28) zurückzuführen ist, eine Beeinflussung durch Cortisol, ACTH und β -LPH alleine oder in Kombination aber nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Welche physiologischen Mechanismen hierbei eine Rolle spielen, kann anhand der durchgeführten Versuche nicht hergeleitet werden.

4.3 LAKTAT

In den durchgeführten Versuchen kam es zu einem signifikanten Anstieg des interstitiellen Laktats unmittelbar im Anschluss an die CRH-Injektion. Dieser wurde nicht von Veränderungen der Plasma-Laktat-Konzentration begleitet.

Mittels Mikrodialyse konnte das Fettgewebe als eine der Hauptquellen der Laktat-Produktion im Anschluss an eine orale Glukose-Belastung identifiziert werden (70-72). Laktat entsteht unter anderem beim anaeroben Abbau von Glucose aus Pyruvat und kann als alternatives Substrat zur Energie-Bereitstellung dienen (Cori-Zyklus).

In mehreren vorhergehenden *in vivo*-Studien konnte mittels Mikrodialyse gezeigt werden, dass die im Interstitium und Plasma bestimmten Laktat-Spiegel in Ruhe gut miteinander korrelieren (70-72). Dieses Ergebnis fand sich auch in den vorliegenden Versuchen. Weiter konnten Hagström et. al. zeigen, dass nach einer oralen Glukosebelastung ein deutlicherer Laktat-Anstieg im Interstitium als im Serum zu verzeichnen ist (70), was zeigt, dass geringe Erhöhungen der Laktat-Produktion auch ohne Änderungen der Serum-Konzentration einher gehen können, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall war. Dies kann dadurch erklärt werden, dass mittels Mikrodialyse die Metabolite direkt am Entstehungsort bestimmt werden können. Im Plasma kommt es dagegen zu einem Verdünnungseffekt. Zusätzlich kann das entstehende Laktat über den Cori-Zyklus schnell in der Leber metabolisiert werden.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit konnten Gustafsson et al. in einer Mikrodialyse-Studie mit radioaktiv markierter Glucose zeigen, dass ca. $\frac{1}{4}$ der gemessenen Gesamt-Laktat-Produktion lokal im Fettgewebe entsteht (73). Nach definierter körperlicher

Aktivität zeigte sich eine Zunahme der Lipolyse-Produkte, die nicht allein durch eine Lipolyse im Fettgewebe erklärbar war. Die Arbeitsgruppe postuliert daher, dass ein Teil der Metabolite im Mikrodialysat durch Diffusion aus benachbarten Geweben, insbesondere der Skelettmuskulatur, resultiert. Es liegt nahe, dies auch im vorliegenden Experiment anzunehmen, denn im Mausmodell führt CRH zu einer Zunahme der Thermogenese in der Skelettmuskulatur (74), am wahrscheinlichsten durch einen Substratzyklus zwischen Lipogenese und Lipidoxidation. Der Effekt lässt sich durch die Blockade von CRH-R2 abschwächen, bzw. aufheben, was auf einen direkten CRH-Effekt über die membranständigen Rezeptoren hindeutet.

Eine Laktat-Produktion in der Skelettmuskulatur nach der CRH-Applikation lässt sich in der vorliegenden Arbeit anhand des Versuchsaufbaus nicht nachweisen oder gar quantifizieren. Hierfür wäre eine Sondierung der Oberschenkelmuskulatur erforderlich gewesen. Für die Quantifizierung der Laktat-Produktion mittels der von Solinas et al. (74) verwendeten ^{13}C -Methode gilt wie für die $^{133}\text{Xenon}$ -Auswasch-Methode, dass eine Verwendung von radioaktiven Tracern nicht möglich gewesen wäre.

Eine Beeinflussung der Laktat-Produktion durch die POMC-Derivate ist nicht bekannt. Der enge zeitliche Zusammenhang der metabolischen Veränderungen mit der intravenösen CRH-Injektion legt einen direkten CRH-Effekt an den Adipozyten nahe. Eine zusätzliche Laktat-Produktion in der benachbarten Skelettmuskulatur mit Diffusion in das subkutane Fettgewebe ist allerdings möglich.

4.4 GLUKOSE

Im Gegensatz zu Placebo führte die CRH-Injektion zu einer unmittelbaren, biphasischen Erhöhung der interstitiellen Glukose-Konzentration. Das erste Maximum fand sich nach 15 Minuten gefolgt von einem kurzen Abfall auf Basalwerte. Nach 45 Minuten zeigte sich ein erneuter, kontinuierlicher Anstieg mit einem zweiten Maximum nach 90 Minuten. Interessanterweise fanden sich diese Veränderungen im Plasma nicht.

Unter physiologischen Bedingungen ist die per Mikrodialyse bestimmte interstitielle Glukose-Konzentration ein guter Indikator für die Plasma-Glukose (61). Änderungen

im Interstitium sollten sich daher auch im Plasma wiederfinden. Die Tatsache, dass dies in der vorliegenden Arbeit nicht nachvollziehbar war, könnte, wie die Änderungen der Laktat-Konzentrationen, durch eine geringe lokal begrenzte Erhöhung der interstitiellen Metabolite bedingt sein. Der Glukose-Anstieg lässt sich aber nicht auf das Injektionstrauma zurückführen, denn in den vorliegenden Experimenten wurde eine 30-minütige Äquibrillierungsphase vor Versuchsbeginn eingehalten, die ausreichend ist, um eine Normalisierung der durch das Injektionstrauma freigesetzten Mediatoren (z.B. Glucose und ATP) zu gewährleisten (61). Eine insuffiziente Äquibrillation müsste zudem auch zu Abweichungen in der Placebo-Gruppe führen.

Glukose wird aus dem Plasma über den insulinabhängigen Glukosetransporter GLUT 4 in die Adipozyten und die Skelettmuskulatur aufgenommen und metabolisiert. Eine finnische Arbeitsgruppe um Virtanen konnte zeigen, dass während einer euglykämischen Hyperinsulinämie die Glukose-Aufnahme des subkutanen Fettgewebes bei gesunden Probanden lediglich einen Anteil von 8% an der Gesamt-Glukose-Aufnahme des Körpers ausmacht (75). Hierbei ist die Insulin-vermittelte Glukose-Aufnahme im visceralen Fettgewebe ausgeprägter als im subkutanen Fettgewebe des Oberschenkels. Hiernach erscheint es unwahrscheinlich, dass der Glukose-Anstieg allein durch eine vermehrte Aufnahme aus dem Plasma erfolgen könnte, zumal sich ja keine Änderung der Plasma-Glukose nachweisen ließ. Eine aktive Glukose-Produktion durch die Adipozyten selbst ist bislang noch nicht beschrieben worden und somit eher hypothetisch. Dagegen kann in der Skelettmuskulatur aktiv Glukose produziert und freigesetzt werden. Steigende FFA bewirken eine verminderte Glucose-Aufnahme der Myozyten. Wie bei der Laktat-Produktion, ist es auch hier denkbar, dass ein Teil der metabolischen Veränderungen aus einer Diffusion ins Fettgewebe resultiert. Eine Beeinflussung der Glukose-Aufnahme in die Adipozyten und eine Erhöhung der Glukoneogenese in der Skelettmuskulatur, bedingt durch direkte CRH-Effekte an den membranständigen Rezeptoren, durch die hypophysär sezernierten POMC-Derivate oder durch Cortisol-Effekte ist durchaus denkbar. Der unmittelbar auf die CRH-Injektion folgende

Glukose-Anstieg im Mikrodialysat weist auf einen Mechanismus über membranständige Rezeptoren hin. Bislang wurden weder für CRH, noch für die POMC-Derivate oder für das Cortisol solche Effekte beschrieben, so dass diesbezüglich weiterführende Studien erforderlich sind. Der zweite, verzögerte Glukose-Anstieg im Interstitium lässt sich dagegen gut durch die trägen genomischen Effekte der Glukocorticoide erklären.

4.5 DAUER DER CRH-EFFEKTE

Letztlich stellt sich die Frage, warum die postulierten CRH-Effekte so rasch wieder sistieren. Im Gegensatz zu dem früher im klinischen CRH-Test verwendeten ovinen CRH, hat humanes CRH eine signifikant kürzere Halbwertszeit von nur 9 Minuten. Im Plasma bindet es rasch an das Bindungsprotein (CRH-bp) und wird durch Peptidasen degradiert, so dass es seine Effekte nicht mehr generieren kann (37). Die Tatsache, dass die CRH-Effekte bereits nach einer Versuchsdauer von 30 Minuten – also der 3fachen Halbwertszeit – bereits rückläufig waren, stützt die Hypothese einer CRH-vermittelten Reaktionskaskade. Zusätzlich ist aus *in vitro*-Experimenten bekannt, dass steigende Glycerol-Spiegel, wie sie sich in der vorliegenden Studie nachweisen ließen, die lipolytische Potenz von β -LPH und anderen Peptidhormonen hemmen können (76). Somit besteht ein zweiter möglicher Mechanismus der CRH-Inaktivierung.

Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen, konnte eine Arbeitsgruppe einen negativen Einfluss von CRH auf die Lipolyse *in vitro* nachweisen (19). Somit könnten die CRH-Effekte abhängig von der Dauer der CRH-Wirkung sein, bzw. durch eine Down-Regulation der CRH-Rezeptoren moduliert werden. Für letztere These sprechen die Ergebnisse von Seres et al., die eine verminderte Expression der CRH-R mRNA in Adipozyten nach einer Langzeitinkubation mit CRH *in vitro* nahe legen (28).

4.6 KLINISCHE BEDEUTUNG UND AUSBLICK

Die Regulation der Energiehomöostase wird durch komplexe Mechanismen gesteuert. Wie bereits in vorhergehenden Studien, konnten wir durch die vorliegende Arbeit

zeigen, dass CRH deutliche Effekte auf den Fettstoffwechsel hat. Konnten in den bislang vorliegenden Studien vorwiegend zentrale CRH-Effekte auf das Essverhalten und den Energieverbrauch – unter anderem durch eine Interaktion mit dem Leptin-System – gezeigt werden, so legt die vorliegende Arbeit auch periphere CRH-Effekte nahe. Unter physiologischen Bedingungen könnte die CRH-vermittelte Mobilisierung der Fettspeicher und Erhöhung der Gluconeogenese der kurzfristigen Stressadaptation dienen, bevor die genomischen Cortisol-Wirkungen apparent werden. Zur Überprüfung und weiteren Spezifizierung dieser Hypothese sind weiterführende Untersuchungen sinnvoll. So könnte beispielsweise ein direkter Effekt von CRH an den CRH-Rezeptoren durch die gleichzeitige Applikation eines peripheren CRH-Antagonisten verdeutlicht werden. Ließen sich die gefundenen metabolischen Veränderungen durch eine Blockade der CRH-Rezeptoren aufheben, würde dies die These stützen. Bislang wurden in Experimenten nur unspezifische CRH-Antagonisten (z.B. alpha-helikales CRH) verwendet. Für den Nachweis spezifischer CRH-Effekte am CRH-R2 an den Adipozyten wäre die Verwendung eines entsprechenden Antagonisten sinnvoll. Nach unserem Kenntnisstand sind diese bislang nicht für Humanexperimente verfügbar.

Um zusätzlich eine lokale Wirkung von CRH auf das Fettgewebe *in vivo* zu untersuchen, wäre eine Mikrodialyse mit einem CRH-haltigem Perfusat optimal. Leider reicht die Porengröße (20 000 Dalton) unserer Membran nicht aus, um ausreichende Mengen CRH vom Dialysat in das Interstitium diffundieren zu lassen. Hierzu wären Membranen mit einem höheren Cutoff (100 000 Dalton) nötig, die aber für Humanversuche zum Zeitpunkt der Experimente noch nicht zur Verfügung standen.

Da vorhergehende Studien metabolische Unterschiede zwischen dem visceralen und subkutanen Fettgewebe beschrieben haben, wäre auch eine Untersuchung des CRH-Effektes auf das viscerale Fettgewebe – insbesondere vor dem Hintergrund einer erhöhten Inzidenz des metabolischen Syndroms bei Patienten mit erhöhter Hip-to-waist-Ratio – von großem Interesse. Um die Rolle der HPA-Achse bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Adipositas zu untersuchen, wäre darüber hinaus eine Untersuchung der CRH-vermittelten Lipolyse bei übergewichtigen oder adipösen

Probandinnen sinnvoll. Denkbar ist, dass eine Adipositas mit einer modifizierten Ansprache der CRH-R auf die Stimulation assoziiert ist, so dass es zu einer verminderten oder lokal unterschiedlichen Fettmobilisation kommt.

Das zunehmende Verständnis, das wir durch die Erforschung des Fettstoffwechsels unter physiologischen und pathologischen Bedingungen gewinnen, bietet langfristig gesehen verschiedene Möglichkeiten der Prävention und Therapie. Da die zentrale Applikation von CRH im Mausmodell eine verminderte Nahrungsaufnahme bewirkt, könnte ein zentral wirksamer CRH-R-Agonist als Therapeutikum zur Gewichtsreduktion bei Adipositas und zu einer Normalisierung eines erlernten falschen Essverhaltens eingesetzt werden. Gleichzeitig müsste eine Aktivierung der corticotropen Achse mit daraus resultierendem Hypercortisolismus vermieden werden. Aber auch peripher wirksame CRH-R-Agonisten sind nach den vorliegenden Ergebnissen aus therapeutischer Sicht interessant und könnten zur Reduktion der Fettmasse, und somit eines der Hauptfaktoren für eine periphere Insulinresistenz, eingesetzt werden. Problematisch ist allerdings die Applikationsform. Da CRH-R-Agonisten - wie das CRH selbst - Peptide sind, kommt eine orale Gabe nicht in Frage, da es zur Inaktivierung der Substanzen im Magen-Darm-Trakt kommt. Die intranasale Applikationsform ist sicherlich am geeignetsten für eine ambulante Therapie. Dagegen könnte eine intravenöse Therapie nur unter stationären Bedingungen durchgeführt werden und ist somit eher theoretisch. Alternativ böte sich die subkutane Applikation an, die leicht von den Patienten erlernt werden könnte. Dies reduziert jedoch die Akzeptanz seitens der Patienten, zumal andere, „bequemere“ Medikamente zur Verfügung stehen. In klinischen Studien wären zudem Langzeiteffekte und Nebenwirkungen zu untersuchen, da eine Dauerstimulation der CRH-R zu einer Down-Regulation der Rezeptoren und somit zu einer verminderten Wirkung führen kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit ist die erste, die in einer doppelblinden, Placebo kontrollierten Studie an 12 normal gewichtigen gesunden Frauen (BMI $22,75 \pm 1,33 \text{ kg/m}^2$ [Mittelwert \pm SD]) die Effekte von intravenös appliziertem CRH auf die Lipolyse im subkutanen Fettgewebe *in vivo* untersucht. Mittels Mikrodialyse wurden die interstitiellen Konzentrationen von Glycerol, Laktat und Glukose im Anschluss an eine intravenöse CRH-Gabe ($1\mu\text{g/kg}$) im lateralen Oberschenkel gemessen. Gleichzeitig wurde die lokale Perfusion der Haut und des subkutanen Fettgewebes mit der Laser-Doppler-Flowmetrie bestimmt und die Ableitung der sympathischen Nervenaktivität im untersuchten Bereich über eine Punktion des Nervus cutaneus lat. vorgenommen.

CRH führte zu einem raschen, signifikanten Anstieg von Glycerol ($19.0 \pm 5.4 \%$, $p < 0.05$), Laktat ($20.2 \pm 5.8 \%$, $p < 0.001$) und Glukose ($13.5 \pm 5.8 \%$, $p < 0.05$) im Interstitium mit einem Maximum nach 15 Minuten. Im Plasma kam es gleichzeitig zu einem Anstieg von Glycerol und FFA ($16.7 \pm 5.9 \%$, $p < 0.05$, bzw. $15.6 \pm 4.6 \%$, $p < 0.05$), während die Laktat- und Glukosekonzentration unverändert blieben. Diese auf eine lokale Lipolyse hindeutenden Änderungen des Fettgewebismetabolismus dauerten nur wenige Minuten an; bereits 25 Minuten nach Injektion bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verum- und Placebo-Gruppe mehr.

Die beschriebenen Effekte lassen sich weder durch Abweichungen im Blutfluss erklären, noch durch die zu erwartenden Serum-Cortisol- und Plasma-ACTH-Erhöhungen. Es kam lediglich zu einer kurz andauernden signifikanten Zunahme der Hautperfusion mit einem Maximum nach 3 Minuten, ein Effekt, der bereits als CRH-Wirkung bekannt ist. Die subkutane Durchblutung blieb unverändert. Der Cortisol- und ACTH-Anstieg trat zeitversetzt mit einem Maximum nach 45 Minuten auf, was eine Beeinflussung des Fettgewebismetabolismus durch diese beiden Hormone unwahrscheinlich erscheinen lässt, wenn auch nicht sicher ausschließt.

Auch eine Aktivierung des sympathischen Nervensystems kann zu einer Lipolyse führen. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen ließ sich jedoch, bei nur wenigen erfolgreichen Ableitungen und somit insgesamt kleiner

Stichprobe, keine signifikant vermehrte sympathische Nervenaktivität im Nervus cutaneus lat. detektieren.

Unerwartet kam es zu einem zweiten Anstieg der interstitiellen Glukose-Konzentration nach 45 Minuten mit einem Maximum ($34.2 \pm 7.7 \%$, $p < 0.001$) nach 90 Minuten, der sich nicht in der Plasma-Glukose widerspiegelte. Eine Glukose-Produktion durch die Adipozyten ist nicht bekannt. Daher könnte eine verminderte Glukose-Aufnahme in die Fettzelle oder eine Zunahme der Gluconeogenese in der Skelettmuskulatur durch genomische Cortisol-Effekte mit Transport in das benachbarte Fettgewebe der Grund für den Glukose-Anstieg sein. Der Nachweis von CRH-Rezeptoren in der Haut und im subkutanen Fettgewebe sowie der direkte zeitliche Zusammenhang zwischen der intravenösen CRH-Gabe und den beschriebenen Abweichungen im Fettgewebsmetabolismus lassen einen unmittelbaren Einfluss von CRH auf die Adipozyten wahrscheinlich erscheinen. Erstmals konnte somit die vorliegende Studie zeigen, dass CRH beim Menschen ein signifikantes lipolytisches Potential besitzt. Weitere Studien müssen die genauen Mechanismen der CRH-vermittelten Lipolyse beim Menschen *in vivo* ebenso klären wie die Relevanz für die Pathophysiologie der Gewichtsregulation und den therapeutischen Einsatz von CRH-Agonisten für die Gewichtsabnahme.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Rosenbaum M, Leibel RL, Hirsch J. Obesity. *N.Engl.J Med.* 1997;337(6):396-407.
2. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37(12):1595-607.
3. Gratzl M. Fettgewebe. In: Junqueira, Carneiro. *Histologie*. Springer; 2005. p. 75-80.
4. Bartness TJ, Bamshad M. Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *Am.J.Physiol* 1998;275(5 Pt 2):R1399-R1411.
5. Flechtner-Mors M, Ditschuneit HH, Yip I, Adler G. Sympathetic modulation of lipolysis in subcutaneous adipose tissue: effects of gender and energy restriction. *J.Lab Clin.Med.* 1999;134(1):33-41.
6. Dodt C, Lonroth P, Fehm HL, Elam M. The subcutaneous lipolytic response to regional neural stimulation is reduced in obese women. *Diabetes* 2000;49(11):1875-9.
7. Arner P, Hoffstedt J. Adrenoceptor genes in human obesity. *J Intern.Med.* 1999;245(6):667-72.
8. Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, Van Eden CG, Havekes LM, Kalsbeek A et al. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat - functional implications. *Journal of Clinical Investigation* 2002;110(9):1243-50.
9. Ballard KW. Functional characteristics of the microcirculation in white adipose tissue. *Microvasc.Res.* 1978;16(1):1-18.
10. Siiteri PK. Adipose tissue as a source of hormones. *Am.J.Clin.Nutr.* 1987;45(1 Suppl):277-82.
11. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372(6505):425-32.
12. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2004;89(6):2548-56.
13. Lang F, Verrey F. Hormone. In: Schmidt, Thews, *Physiologie des Menschen*. Springer; 2005. p. 459-89.
14. Guillemin R, Rosenberg B. Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: a study with combined tissue cultures. *Endocrinology* 1955;57(5):599-607.

15. Saffran M, Schally AV. The release of corticotrophin by anterior pituitary tissue in vitro. *Can.J Biochem.Physiol* 1955;33(3):408-15.
16. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 1981;213(4514):1394-7.
17. Dörr H-G. Störungen der Nebennieren. In: Kruse K, Pädiatrische Endokrinologie. Thieme; 1999. p. 73-110.
18. Stewart PM. The adrenal cortex. *Williams Textbook of Endocrinology*. 10 ed. Saunders; 2002. p. 491-551.
19. Friedberg M, Zoumakis E, Hiroi N, Bader T, Chrousos GP, Hochberg Z. Modulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in mature human subcutaneous adipocytes by hypothalamic messengers. *J Clin.Endocrinol.Metab* 2003;88(1):385-93.
20. Sudhir K, Jennings GL, Esler MD, Korner PI, Blombery PA, Lambert GW et al. Hydrocortisone-induced hypertension in humans: pressor responsiveness and sympathetic function. *Hypertension* 1989;13(5):416-21.
21. Kiwaki K, Levine JA. Differential effects of adrenocorticotrophic hormone on human and mouse adipose tissue. *J.Comp Physiol [B]* 2003;173(8):675-8.
22. Dodt C, Wallin G, Fehm HL, Elam M. The stress hormone adrenocorticotropin enhances sympathetic outflow to the muscle vascular bed in humans. *J.Hypertens*. 1998;16(2):195-201.
23. Bousquet-Melou A, Galitzky J, Lafontan M, Berlan M. Control of lipolysis in intra-abdominal fat cells of nonhuman primates: comparison with humans. *J.Lipid Res*. 1995;36(3):451-61.
24. Perrin MH, Vale WW. Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. 1999;885:312-28.
25. Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK et al. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat.Genet*. 1998;19(2):162-6.
26. Slominski A, Ermak G, Mazurkiewicz JE, Baker J, Wortsman J. Characterization of corticotropin-releasing hormone (CRH) in human skin. *J Clin.Endocrinol.Metab* 1998;83(3):1020-4.
27. Hiroi N, Wong ML, Licinio J, Park C, Young M, Gold PW et al. Expression of corticotropin releasing hormone receptors type I and type II mRNA in suicide victims and controls. *Mol.Psychiatry* 2001;6(5):540-6.

28. Seres J, Bornstein SR, Seres P, Willenberg HS, Schulte KM, Scherbaum WA et al. Corticotropin-releasing hormone system in human adipose tissue. *J Clin.Endocrinol.Metab* 2004;89(2):965-70.
29. Smith SR, de Jonge L, Pellymounter M, Nguyen T, Harris R, York D et al. Peripheral administration of human corticotropin-releasing hormone: a novel method to increase energy expenditure and fat oxidation in man. *J Clin.Endocrinol.Metab* 2001;86(5):1991-8.
30. Bornstein SR, Webster EL, Torpy DJ, Richman SJ, Mitsiades N, Igel M et al. Chronic effects of a nonpeptide corticotropin-releasing hormone type I receptor antagonist on pituitary-adrenal function, body weight, and metabolic regulation. *Endocrinology* 1998;139(4):1546-55.
31. Chong PK, Jung RT, Bartlett WA, Browning MC. The acute effects of corticotropin-releasing factor on energy expenditure in lean and obese women. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 1992;16(7):529-34.
32. Richard D, Lin Q, Timofeeva E. The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of energy balance. *Eur.J.Pharmacol.* 2002;440(2-3):189-97.
33. Brown MR, Fisher LA, Spiess J, Rivier C, Rivier J, Vale W. Corticotropin-releasing factor: actions on the sympathetic nervous system and metabolism. *Endocrinology* 1982;111(3):928-31.
34. Fisher LA. Central actions of corticotropin-releasing factor on autonomic nervous activity and cardiovascular functioning. *Ciba Found.Symp.* 1993;172:243-53.
35. Nink M, Krause U, Lehnert H, Beyer J. Safety and side effects of human and ovine corticotropin-releasing hormone administration in man. *Klin.Wochenschr.* 1991;69(5):185-95.
36. Crompton R, Clifton VL, Bisits AT, Read MA, Smith R, Wright IM. Corticotropin-releasing hormone causes vasodilation in human skin via mast cell-dependent pathways. *J Clin.Endocrinol.Metab* 2003;88(11):5427-32.
37. Saphier PW, Faria M, Grossman A, Coy DH, Besser GM, Hodson B et al. A comparison of the clearance of ovine and human corticotrophin-releasing hormone (CRH) in man and sheep: a possible role for CRH-binding protein. *J.Endocrinol.* 1992;133(3):487-95.
38. Arase K, York DA, Shimizu H, Shargill N, Bray GA. Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am.J.Physiol* 1988;255(3 Pt 1):E255-E259.
39. Uehara Y, Shimizu H, Ohtani K, Sato N, Mori M. Hypothalamic corticotropin-releasing hormone is a mediator of the anorexigenic effect of leptin. *Diabetes* 1998;47(6):890-3.

40. Irwin M, Hauger R, Brown M. Central corticotropin-releasing hormone activates the sympathetic nervous system and reduces immune function: increased responsivity of the aged rat. *Endocrinology* 1992;131(3):1047-53.
41. Clifton VL, Crompton R, Smith R, Wright IM. Microvascular effects of CRH in human skin vary in relation to gender. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2002;87(1):267-70.
42. Parati G, Casadei R, Groppelli A, Di Rienzo M, Mancia G. Comparison of finger and intra-arterial blood pressure monitoring at rest and during laboratory testing. *Hypertension* 1989;13(6 Pt 1):647-55.
43. Holloway GA, Jr., Watkins DW. Laser Doppler measurement of cutaneous blood flow. *J.Invest Dermatol.* 1977;69(3):306-9.
44. Wellhoener P, Rolle D, Lonroth P, Strindberg L, Elam M, Dodt C. Laser Doppler Flowmetry reveals rapid perfusion changes in adipose tissue of lean and obese females. *Am.J Physiol Endocrinol Metab* 2006.
45. Choi CM, Bennett RG. Laser Dopplers to determine cutaneous blood flow. *Dermatol.Surg.* 2003;29(3):272-80.
46. Hagbarth KE, Vallbo AB. Mechanoreceptor activity recorded percutaneously with semi-microelectrodes in human peripheral nerves. *Acta Physiol Scand.* 1967;69(1):121-2.
47. Hagbarth KE, Vallbo AB. Pulse and respiratory grouping of sympathetic impulses in human muscle-nerves. *Acta Physiol Scand.* 1968;74(1):96-108.
48. Vallbo AB, Hagbarth KE. Impulses recorded with micro-electrodes in human muscle nerves during stimulation of mechanoreceptors and voluntary contractions. *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.* 1967;23(4):392.
49. Vallbo AB, Hagbarth KE. Mechnoreceptor activity recorded from human peripheral nerves. *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.* 1968;25(4):407.
50. Vallbo AB, Hagbarth KE, Torebjork HE, Wallin BG. Somatosensory, proprioceptive, and sympathetic activity in human peripheral nerves. *Physiol Rev.* 1979;59(4):919-57.
51. Vallbo AB, Hagbarth KE, Wallin BG. Microneurography: how the technique developed and its role in the investigation of the sympathetic nervous system. *J Appl.Physiol* 2004;96(4):1262-9.
52. Delius W, Hagbarth KE, Hongell A, Wallin BG. General characteristics of sympathetic activity in human muscle nerves. *Acta Physiol Scand.* 1972;84(1):65-81.

53. Delius W, Hagbarth KE, Hongell A, Wallin BG. Manoeuvres affecting sympathetic outflow in human skin nerves. *Acta Physiol Scand.* 1972;84(2):177-86.
54. Hagbarth KE, Hallin RG, Hongell A, Torebjork HE, Wallin BG. General characteristics of sympathetic activity in human skin nerves. *Acta Physiol Scand.* 1972;84(2):164-76.
55. Wallin BG. Neural control of human skin blood flow. *J.Auton.Nerv.Syst.* 1990;30 Suppl:S185-S190.
56. Gaddum J. Push-pull cannulae. *J.Physiol* 1961;155:1-2.
57. Ungerstedt U, Pycock C. Functional correlates of dopamine neurotransmission. *Bull.Schweiz.Akad.Med.Wiss.* 1974;30(1-3):44-55.
58. Benveniste H, Huttemeier PC. Microdialysis-theory and application. *Prog.Neurobiol.* 1990;35(3):195-215.
59. Lonroth P, Jansson PA, Smith U. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. *Am.J.Physiol* 1987;253(2 Pt 1):E228-E231.
60. Bolinder J, Kerckhoffs DA, Moberg E, Hagstrom-Toft E, Arner P. Rates of skeletal muscle and adipose tissue glycerol release in nonobese and obese subjects. *Diabetes* 2000;49(5):797-802.
61. Bolinder J, Hagstrom E, Ungerstedt U, Arner P. Microdialysis of subcutaneous adipose tissue in vivo for continuous glucose monitoring in man. *Scand.J.Clin.Lab Invest* 1989;49(5):465-74.
62. Larsen OA, Lassen NA, Quaade F. Blood flow through human adipose tissue determined with radioactive xenon. *Acta Physiol Scand.* 1966;66(3):337-45.
63. Vaughan M. Effect of hormones on glucose metabolism in adipose tissue. *J.Biol.Chem.* 1961;236:2196-9.
64. Simonsen L, Bulow J, Madsen J. Adipose tissue metabolism in humans determined by vein catheterization and microdialysis techniques. *Am.J.Physiol* 1994;266(3 Pt 1):E357-E365.
65. Richter WO, Schwandt P. In vitro lipolysis of proopiomelanocortin peptides. *Life Sci.* 1983;33 Suppl 1:747-50.
66. Richter WO, Schwandt P. Physiologic concentrations of beta-lipotropin stimulate lipolysis in rabbit adipocytes. *Metabolism* 1985;34(6):539-43.
67. Gibson S, Crosby SR, Stewart MF, Jennings AM, McCall E, White A. Differential Release of Proopiomelanocortin-Derived Peptides from the Human Pituitary - Evidence from A Panel of 2-Site Immunoradiometric

- Assays. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994;78(4):835-41.
68. Jackson RV, DeCherney GS, DeBold CR, Sheldon WR, Alexander AN, Rivier J et al. Synthetic ovine corticotropin-releasing hormone: simultaneous release of proopiomelanocortin peptides in man. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1984;58(4):740-3.
69. Djurhuus CB, Gravholt CH, Nielsen S, Pedersen SB, Moller N, Schmitz O. Additive effects of cortisol and growth hormone on regional and systemic lipolysis in humans. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 2004;286(3):E488-E494.
70. Hagstrom E, Arner P, Ungerstedt U, Bolinder J. Subcutaneous adipose tissue: a source of lactate production after glucose ingestion in humans. *Am.J.Physiol* 1990;258(5 Pt 1):E888-E893.
71. Jansson PA, Larsson A, Smith U, Lonroth P. Lactate release from the subcutaneous tissue in lean and obese men. *J.Clin.Invest* 1994;93(1):240-6.
72. Jansson PA, Smith U, Lonroth P. Evidence for lactate production by human adipose tissue in vivo. *Diabetologia* 1990;33(4):253-6.
73. Gustafsson J, Eriksson J, Marcus C. Glucose metabolism in human adipose tissue studied by ¹³C-glucose and microdialysis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2007;67(2):155-64.
74. Solinas G, Summermatter S, Mainieri D, Gubler M, Montani JP, Seydoux J et al. Corticotropin-Releasing Hormone Directly Stimulates Thermogenesis in Skeletal Muscle Possibly through Substrate Cycling between de Novo Lipogenesis and Lipid Oxidation. *Endocrinology* 2006;147(1):31-8.
75. Virtanen KA, Lonroth P, Parkkola R, Peltoniemi P, Asola M, Viljanen T et al. Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2002;87(8):3902-10.
76. Baumeister RG, Richter WO, Riel KA, Schwandt P, Bohmert H. Regulation of lipolysis--biochemical research on the fat cells of obese patients. *Handchir.Mikrochir.Plast.Chir* 1986;18(3):115-7.

7 ANHANG

7.1 LISTE DER VERWENDETEN MATERIALIEN

| | |
|------------------------------------|--|
| ACTH Immunoassay | IMMULITE®ACTH, DPC®, Los Angeles, USA |
| CMA Perfusion Fluid T1® | CMA/Microdialysis AB, Stockholm, Schweden |
| Cortisol Immunoassay | IMMULITE®Cortisol, DPC®, Los Angeles, USA |
| Finapres™ | Ohmeda Monitoring System, Englewood; Colorado, USA |
| Laser-Doppler-Sonde (subcutan) | Probe 402 (needle probe), Perimed, Järfälla, Schweden |
| Laser-Doppler-Sonde (Haut) | Probe 407-1 (small straight probe), Perimed, Järfälla, Schweden |
| Mikrodialyse-Katheter CMA60 | Membranlänge: 30mm, Cut-off: 20 kD, CMA/Microdialysis AB, Stockholm, Schweden |
| Mikrodialyse-Pumpe | CMA/Microdialysis AB, Stockholm, Schweden |
| Mikroneurographie-Verstärker | T. Karlsson, Göteborg, Schweden |
| Mikrovials | CMA/Microdialysis AB, Stockholm, Schweden |
| Monovetten® | Fa. Sarstedt, D-51588 Nümbrecht |
| NaCl 0,9%-Lösung | B. Braun Melsungen AG, Deutschland |
| Perfusorleitung Injectomat® 150 cm | Fresenius Kabi, Homburg, Deutschland |
| Reaktionsgefäß 1,5 ml | Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Software | GraphPad Prism 4.0, GraphPad Software Inc. San Diego, Californien, USA Perimed, Järfälla, Schweden Powerlab®, Spechbach, Deutschland Reference Manager 10.0, ISI Research Software, California, USA SigmaPlot 8.0, Systat Software Inc., San Jose, Californien, USA |
| Stimulator Grass® S48 | Grass Instrument Company, Quincy, Mass., USA |
| Venflon™ | 1,2/45 mm (i.v.), 0.8/25 mm (s.c.) |
| Zentrifuge EBA 21 | Fa. Hettich, Tuttlingen, Deutschland |

7.2 PROBANDENAUFKLÄRUNG

Sehr geehrte Probandin,

Vielen Dank für Ihr Interesse, an unserem wissenschaftlichen Projekt als Versuchsperson teilzunehmen. Nachfolgend möchten wir Ihnen erklären, welchen Zweck unsere Versuche haben und wie der Versuchsablauf im Einzelnen aussieht.

Hintergrund:

Sinn unserer Studie ist es, die Auswirkungen von Nervenreizen und Hormonen, den körpereigenen Botenstoffen, auf die Durchblutung des Fettgewebes und der Haut und den damit verbundenen Fettabbau zu untersuchen. Wie verändern Hormone und Nervenreize die Durchblutung und den Fettabbau? Verändern Hormone die Wirkung der Nervenimpulse oder beeinflussen sie den Fettstoffwechsel auf eine andere Art und Weise? Dies sind Fragen, die durch unser Experiment geklärt werden sollen.

Wir wollen zuerst den Einfluss des Steuerungshormon der menschlichen Stressachse, dem sogenannten Corticoliberin (CRH), untersuchen. Dieses Hormon wird unter Stress vermehrt im Gehirn gebildet und passt so den Organismus an die entsprechende Situation an.

Zur Messung der Nervenimpulse, der Durchblutung und des Fettabbaus stehen sehr genaue Methoden zur Verfügung, die sich bereits in voran gegangenen Experimenten bewährt haben.

Voraussetzungen:

Um an unserer Studie teil nehmen zu können, sollten Sie verschiedene Voraussetzungen erfüllen:

Natürlich sollten Sie gesund sein. Das bedeutet, dass Sie nicht regelmäßig Medikamente einnehmen (auch nicht die „Pille“) und nicht in regelmäßiger ärztlicher Behandlung sind. Auch sollten Sie nicht älter als 40 Jahre und Nichtraucherin sein, da ein andauernder Nikotin-Genuss unsere Ergebnisse

verfälschen würde. Aus dem gleichen Grund sollten sie in der letzten Woche keine Nacharbeit und in den letzten 4 Wochen keinen extremen Ausdauersport gemacht haben. Natürlich werden wir Sie vor den Experimenten untersuchen. Alle Ihre Daten werden von uns verschlüsselt und selbstverständlich anonym gehalten. Sollten Sie für unsere Versuche alle Voraussetzungen erfüllen, werden wir Sie als Probandin in unsere Studie aufnehmen. Als Aufwandsentschädigung erhalten Sie 140 €.

Abfolge des Versuches:

Sie werden gebeten, am Versuchstag nüchtern, d.h. Sie dürfen mindestens 4 Stunden vorher nichts gegessen oder getrunken haben, in unserer Versuchseinheit zu erscheinen. Der Versuch dauert ca. 3,5 Stunden.

Sie werden während des gesamten Versuches auf einem Bett in halbsitzender Position möglichst bequem gelagert. Zur Messung des Fettgewebsstoffwechsels wird nun eine feine, sogenannte Mikrodialysesonde in das Unterhaut – Fettgewebe eingebracht. Etwa eine Stunde braucht das Gerät, um sich auf Sie einzustellen. Während dieser Zeit werden Sie weiter „verkabelt“: Für die Dauer des gesamten Versuches zeichnen wir Ihren Blutdruck, Ihr EKG, Ihre Atmung, Herzfrequenz und Hauttemperatur auf, um eventuelle Veränderungen sofort feststellen zu können. Anschließend legen wir Ihnen noch einen dünnen Katheter in eine Unterarmvene, um später das Hormon applizieren und während des Versuches Blutproben entnehmen zu können (insgesamt 100 ml). Es wird der Hautnerv etwas seitlich des Beckenknochens durch elektrische Stimulation durch die Haut aufgesucht und anschließend mit einer feinen Fieberglassonde punktiert. Man spürt ein leichtes Kribbeln am seitlichen Oberschenkel. Dieses Gebiet wird mit einem Stift markiert und vermessen. Zur Messung der Fettgewebsdurchblutung benutzen wir ebenfalls eine haarfeine Fiberglassonde, die in der Nähe der ersten Sonde in das Fettgewebe eingebracht wird. Die Sonden verursachen in der Regel keine Schmerzen und werden nach dem Versuch wieder herausgenommen. Die Durchblutung der Haut wird mit einer Klebesonde gemessen. Wenn alle Vorbereitungen abgeschlossen sind, kann das eigentliche Experiment beginnen.

Nach einer 30-minütigen Ruhephase bekommen Sie das Hormon über den Katheter in die Vene appliziert, anschließend wird die Änderung der gemessenen Parameter über zwei Stunden verfolgt. Gegen Ende des Versuches wird der Hautnerv für 10 Minuten gereizt. Die Intensität, mit der der Nerv gereizt wird, können Sie selbst bestimmen, indem Sie angeben, wann die Schmerzgrenze erreicht ist. Sie sollen keine unnötigen Schmerzen ertragen müssen.

Da Hormone als körpereigene Substanzen zu keiner Beeinträchtigung führen, können Sie nach dem Versuch ohne Einschränkungen Ihrem gewohnten Tagesablauf nachgehen.

Die Risiken bei unserem Experiment sind sehr gering und leicht zu beherrschen: Wir arbeiten zwar steril d.h. keimfrei, wenn wir die Venenverweilkanülen und die Fiberglassonden einbringen, trotzdem können leichte Rötungen oder örtliche Reizungen an den Einstichstellen auftreten. Weiterhin können bei der Punktion in den Oberschenkel unbeabsichtigt kleine Hautgefäße getroffen werden, was eventuell einen „blauen Fleck“ zur Folge haben kann. Das Hormon kann selten Allergie-ähnliche Symptome wie Haut- und Gesichtsrötung, Jucken oder Hitzegefühl sowie Übelkeit und Erbrechen hervorrufen. Zudem kann es zu einem Blutdruckabfall kommen. Sollte während des Versuches irgendeine Komplikation auftreten, wird der Versuch sofort abgebrochen. Eine Aufwandsentschädigung erhalten Sie dann trotzdem. Sie selbst können den Versuch jederzeit ohne Angabe von Gründen abbrechen. Natürlich sind Sie gegen alle Schäden, die während des Versuches auftreten können, über die Medizinische Universität zu Lübeck versichert.

Sicher haben Sie noch einige Fragen. Bitte scheuen Sie sich nicht, diese jetzt oder zu einem späteren Zeitpunkt zu stellen.

7.3 LEBENS LAUF

| | |
|-------------------|---------------------------------|
| Name | Maik Welzel |
| Adresse | Lornsenstr. 37, 24105 Kiel |
| Geburtsdatum/-ort | 26.09.1977, Wildeshausen |
| Familienstand | verheiratet |
| e-Mail | m.welzel@pediatrics.uni-kiel.de |

Schulische Ausbildung und beruflicher Werdegang

| | |
|-------------------|--|
| 08/1984 - 06/1988 | Grundschule Rechterfeld |
| 08/1988 - 06/1997 | Gymnasium Kolleg St. Thomas, Vechta |
| 07/1997 - 08/1998 | Zivildienst als Rettungssanitäter, Malteser gGmbH, Wildeshausen |
| 10/1998 - 04/2005 | Medizinstudium an der Universität Lübeck |
| 08/2002 - 03/2003 | Auslandssemester in Bergen, Norwegen |
| Seit 01.06.2005 | Assistenzarzt in der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, UKSH, Campus Kiel, Schwanenweg 20, 24105 Kiel, Schwerpunkt Pädiatrische Endokrinologie |
| 10/2006 | STEPS (Scientific Training for Endocrinologists in Pediatrics by Serono)-Award der Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Endokrinologie |

Veröffentlichungen/Posterpräsentationen

| | |
|---------|---|
| 03/2005 | Poster: „Acute metabolic effects of corticotropin releasing hormone in human femoral adipose tissue <i>in vivo</i> “ (DGE-Jahrestagung, Münster) |
|---------|---|

-
- 07/2006 **Poster:** „Functional characterization of a novel missense mutation (P341L) in the HSD3B2 gene causing 3 β -HSD-deficiency“ congenital adrenal hyperplasia (ESPE-Jahrestagung, Rotterdam), Abstract: Horm. Research 2006; 65(suppl 4), p. 116
- 09/2006 Wellhoener, **Welzel** et al. „In vivo effects of corticotropin-releasing hormone on femoral adipose tissue metabolism in women.“ Int J Obes 2007 Apr;31(4):718-22
- 09/2006 **Poster:** „Ambiguous genitalia due to a novel missens mutation in the HSD3B2 gene“ (From gene to gender-Tagung, Lübeck)
- 11/2006 **Poster:** „Pseudopubertas praecox durch hormonaktives Nebennierenrindenzarzinom“ (APE-Jahrestagung, Dresden), Abstract: Monatsschrift Kinderheilkunde 2006; 10, p. 1065
- 06/2007 **Poster:** „Short stature due to IGF1-haploinsufficiency?“ (ESPE-Jahrestagung, Helsinki), Abstract: Horm. Research 2007; 68 (suppl. 1); p. 174
- 04/2008 **Welzel** et al.: „Carboxyterminal mutations in 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase cause severe salt-wasting congenital adrenal hyperplasia“ (JCEM 2008 Apr;93(4):1418-25)

7.4 DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung von Prof. Dr. Christoph Dodt, dem ich für die Bereitstellung des Themas und die aktive Betreuung herzlich danke. Zusätzlich wurde ich während der praktischen Durchführung, bei der Auswertung der Daten und beim Schreiben der Arbeit von Dr. Peter Wellhöner mit vielen Anregungen unterstützt. Durch ihre angenehme und heitere Art haben sie mir gezeigt, wie eine wissenschaftliche Tätigkeit und eine gute zwischenmenschliche Beziehung Hand in Hand gehen können. Sicherlich werde ich nie die Frage vergessen, wie teuer eine LDF-Sonde ist, wie könnte ich!!

Ein großer Dank gilt auch Susanne Behling für die Analyse der Proben, vor allem der Lumineszenz-Assays.

Daniela Rolle danke ich für die Einführung in die ersten Schritte der Mikrodiälyse-Technik und Laserdoppler-Flowmetrie sowie für ihre Freundschaft.

Darüber hinaus danke ich den teilnehmenden Probandinnen für die Geduld, mit der sie die lange Versuchszeit klaglos ertragen haben und ohne die die vorliegende Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können.

Meiner Familie und meinen Freunden bin ich sehr dankbar für die Unterstützung meiner Arbeit.

Letztlich danke ich meiner Frau Steffi dafür, dass sie mich in dem, was ich tue, unterstützt und mich daran erinnert, das bisher Erreichte nicht als selbstverständlich anzusehen. Zusätzlich für die Geduld und Genauigkeit, mit der sie fachmännisch die Arbeit mit korrigiert hat.