

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

**Einfluss von intranasal verabreichtem
MSH/ACTH(4-10) auf sympathische Nervenaktivität und
Lipolyse im Fett- und Muskelgewebe**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Ruth Hörster
aus Münster

Lübeck 2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Adipositas	1
1.2 Physiologie des Fettgewebes.....	1
1.3 Regulation des Körpergewichtes.....	3
1.4 Proopiomelanocortin und der „Melanocortin-Rezeptor Pathway“	5
1.4.1 Melanocortinrezeptoren.....	6
1.4.2 Melanocortinerges System und Einfluss auf Energieverbrauch und Nahrungsaufnahme	8
1.4.3 Einfluss von Melanocortinagonisten auf die Lipolyse.....	10
1.4.4 Melanocortinerges System und das sympathische Nervensystem.....	11
1.4.5 Einfluss der Melanocortine auf den Barorezeptorreflex.....	12
1.5 Intranasale Applikation von MSH/ACTH(4-10)	13
1.6 Allgemeine Grundlagen der Mikroneurographie	14
1.7 Allgemeine Grundlagen der Mikrodialyse	16
1.8 Allgemeine Grundlagen der Laser Doppler Flowmetrie	18

2	Fragestellung	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Studiendesign	21
3.2	Versuchsablauf	21
3.3	Probanden	23
3.4	Apparative Messanordnungen.....	23
3.4.1	Mikroneurographie	23
3.4.2	Mikrodialyse	27
3.4.3	Laser Doppler Flowmetrie zur Bestimmung des subkutanen und kutanen Blutflusses.....	28
3.4.4	Pneumobelt®, Finapres®- und EKG-Aufzeichnungen	28
3.4.5	Datenaufzeichnung - Powerlab®	29
3.4.6	Analytik der Proben	29
3.5	Statistik	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Charakterisierung des Gesamtkollektivs	32
4.2	Mikroneurographie	32
4.2.1	Sympathische Nervenaktivität	32
4.2.2	Sympathische Nervenaktivität während der medikamentösen Barorezeptorreflextestung	33
4.3	Vitalparameter.....	34
4.4	Mikrodialyse	34
4.4.1	Interstitielles Glycerol	34

4.4.2	Interstitielles Pyruvat und Laktat.....	36
4.4.3	Interstitielle Glucose	38
4.5	Serum- und Plasmakonzentrationen	39
4.5.1	Glycerol, freie Fettsäuren, Glucose und Laktat.....	39
4.5.2	BNP, Insulin, Adiponektin, Leptin, ACTH und Cortisol	40
4.5.3	Katecholamine.....	41
4.6	Gewebssperfusion	41
5	Diskussion.....	44
5.1	Einfluss von MSH/ACTH(4-10) auf die Lipolyse	46
5.2	Einfluss von MSH/ACTH(4-10) auf die lokale Durchblutung der Haut und des subkutanen Fettgewebes	48
5.3	Einfluss von MSH/ACTH(4-10) auf die sympathische Nervenaktivität	48
5.4	Therapeutische Optionen	52
5.5	Wirkung von Melanocortinagonisten bei Adipositas.....	54
5.6	Limitationen der Studie.....	54
5.7	Klinische Bedeutung und Ausblick	55
6	Zusammenfassung	57
7	Literaturverzeichnis	58

8 Anhang	72
Liste verwendeter Materialien.....	72
Daten von Glucose, Laktat, Glycerol und Pyruvat aus dem Mikrodialysat des weißen abdominellen Fettgewebes und des Muskelgewebes.....	73
Probandenaufklärung.....	75
Ethikvotum	77
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Danksagung.....	78

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
α -MSH	α -Melanozyten stimulierendes Hormon
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
EKG	Elektrokardiogramm
°C	Grad Celsius
HHA-Achse	Hypothalamo-hypophysär-adrenokortikale Achse
Hz	Hertz
icv	intracerebroventrikulär
kg	Kilogramm
LDF	Laser Doppler Flowmetrie
m	Meter
M.	Musculus
μ g	Mikrogramm
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mm	Millimeter
ml	Milliliter
ms	Millisekunde
MSNA	muscle sympathetic nerve activity = Muskuläre sympathische Aktivität
MT II	Melanotan II
MW	Mittelwert
N.	Nervus

NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptid Y
pg	Picogramm
POMC	Proopiomelanocortin
PU	Perfusion Units
RSNA	renal sympathetic nerve activity = renale sympathische Aktivität
SD	Standard deviation
sec.	Sekunde
SEM	Standard error of the mean
SNS	Sympathisches Nervensystem
SSNA	Skin sympathetic nerve activity
Tab.	Tabelle
vs.	versus
WAT	White adipose tissue
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Darstellung des Regelkreises zur Aufrechterhaltung der Energiebalance
Abbildung 2	Schematische Darstellung der Generierung von α -MSH aus Proopiomelanocortin
Abbildung 3	Darstellung der Mikrodialyse
Abbildung 4	Darstellung der Laser Doppler Flowmetrie
Abbildung 5	Darstellung des Versuchsablaufes
Abbildung 6	Beispielhafte Darstellung der sympathischen Nervenaktivität
Abbildung 7	MSNA nach medikamentöser Barorezeptorreflextestung
Abbildung 8	Interstitielle Glycerolkonzentrationen im subkutanen abdominellen weißen Fettgewebe sowie im Muskelgewebe
Abbildung 9	Interstitielle Pyruvatkonzentrationen im subkutanen abdominellen weißen Fettgewebe sowie im Muskelgewebe
Abbildung 10	Interstitielle Laktatkonzentrationen im subkutanen abdominellen weißen Fettgewebe sowie im Muskelgewebe
Abbildung 11	Interstitielle Glucosekonzentrationen im subkutanen abdominellen weißen Fettgewebe sowie im Muskelgewebe
Abbildung 12	Cortisolkonzentration
Abbildung 13	ACTH-Konzentration
Abbildung 14	Adrenalin- und NoradrenalinKonzentration
Abbildung 15	Hautperfusion
Abbildung 16	Fettgewebsperfusion

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Melanocortinrezeptoren im Überblick
Tabelle 2	Analysemethoden von Insulin, Leptin, Adiponektin, Noradrenalin, Adrenalin und Glucose
Tabelle 3	Anthropometrische Daten des Probandenkollektivs
Tabelle 4	Daten von Glucose, Laktat, Glycerol und Pyruvat aus dem Mikrodialysat des weißen abdominellen Fettgewebes
Tabelle 5	Daten von Glucose, Laktat, Glycerol und Pyruvat aus dem Mikrodialysat des Muskelgewebes

1 Einleitung

1.1 Adipositas

Die Adipositas (Fettsucht) ist weltweit ein wachsendes Problem, welches unter anderem durch Fehlernährung, Bewegungsmangel und genetische Faktoren hervorgerufen wird (Rosenbaum et al., 1997). Die Zunahme der Masse des weißen Fettgewebes bedingt eine Reihe Folgeerkrankungen wie Artherosklerose, arteriellen Bluthochdruck, Dyslipidämie und gestörten Glucosestoffwechsel. Diese Erkrankungen wurden 1988 als „Metabolisches Syndrom“ zusammengefasst (Reaven, 1988). Das Auftreten dieser Krankheiten stellt eine große persönliche Bürde für die Betroffenen dar, ist aber auch eine erhebliche Last für die Gemeinschaft der Krankenversicherten. Betrachtet man allein die Adipositas, so entfallen etwa 6% der Gesamtausgaben des deutschen Gesundheitssystems auf die Behandlung dieser Störung (Bundesärztekammer).

Die Erforschung der Physiologie und Pathophysiologie des Fettgewebismetabolismus und seiner Beeinflussung hat daher in den letzten Jahren erheblich an Bedeutung gewonnen.

1.2 Physiologie des Fettgewebes

Der mittlere Gesamt-Fettanteil des Menschen liegt bei etwa 20%, kann aber entsprechend der Ernährungssituation erheblich davon abweichen. Das Fettgewebe hat vielfältige Aufgaben, von denen die Speicherung von Energie die wichtigste ist. Wie bei vielen Tieren unterscheidet man auch beim Menschen das weiße und das braune Fettgewebe. Während das weiße Fettgewebe gut untersucht und unter anderem als endokrines Organ anzusehen ist, wusste man bislang von dem braunen Fettgewebe, dass es vor allem bei Säuglingen für die Thermogenese wichtig ist. Nun stellen jüngste Untersuchungen dar, dass funktionell aktives braunes Fettgewebe auch beim erwachsenen Menschen vorhanden ist. Von besonderer Bedeutung ist hier die inverse Korrelation zwischen dem Vorhandensein und der Menge des braunen Fettgewebes und dem Body-Mass-Index. Diese Erkenntnisse bedeuten, dass auch das braune Fettgewebe eine Rolle im

Metabolismus beim Erwachsenen spielt (Cypess et al., 2009). Das braune Fettgewebe ist im Gegensatz zum subkutanen Fettgewebe dicht sympathisch innerviert (Ochi et al., 1969).

Das weiße Fettgewebe dient als Energiereservoir und zur thermischen Isolierung. Zudem besitzt es zahlreiche endokrine Funktionen. Die Entdeckung des Fettgewebshormons Leptin und zahlreichen weiteren, von Adipozyten sezernierten Hormonen und Peptiden, haben in den letzten Jahren die Bedeutung des weißen Fettgewebes als endokrines Organ, das eine wichtige Rolle in der Energie- und Gewichtshomöostase spielt, in den Vordergrund gerückt.

Mit der Nahrung aufgenommene Triglyceride werden in den Fettzellen gespeichert und bei Hungerzuständen mittels Lipolyse in Fettsäuren und Glycerin gespalten. Die freigesetzten Fettsäuren können so für die Energiegewinnung genutzt werden. Verschiedene Faktoren nehmen hemmenden oder fördernden Einfluss auf die Lipolyse. Sie wird unter anderem durch Insulin und Stimulation von α_2 -Adrenozeptoren gehemmt, durch Stimulation von β -Adrenozeptoren (Subtypen 1-3) gefördert (Bartness et al., 2005, Flechtner-Mors et al., 2002). Die Adrenozeptoren stimulierenden Katecholamine erreichen die Rezeptoren über den Blutweg oder wie beim braunen Fettgewebe auch direkt sympathoneuronal (Dodt et al., 2003). Bei adipösen Individuen ist die sympathikusvermittelte Lipolyse allerdings vermindert (Dodt et al., 2000b). Zudem zeigen verschiedene Mutationen in Adrenozeptoren eine erhöhte Inzidenz für Adipositas (Arner, 1996).

Im Tierversuch zeigt sich auch die Beeinflussung des Fettmetabolismus durch den Parasympathikus. Dabei führt eine Aktivierung der parasympathischen Neurone zu einer gesteigerten, insulin-vermittelten Aufnahme von freien Fettsäuren und Glukose (Kreier et al., 2002). Ob parasympathische Einflüsse auch beim Menschen einen Einfluss auf die Lipolyse haben, ist bisher nicht bekannt.

1.3 Regulation des Körpergewichtes

Die Regulation des Körpergewichtes stellt ein komplexes, wahrscheinlich nur in den Anfängen verstandenes System dar, in dem viele verschiedene Faktoren zusammenspielen. Da viele Regelmechanismen vergleichbare Effekte verursachen, kommt es bei Veränderungen lediglich eines Parameters in diesem redundanten System selten zu leicht fassbaren Effekten.

Der Energiehaushalt und die Nahrungsaufnahme werden im Wesentlichen zentral über den Hypothalamus mittels Feedback-Mechanismen gesteuert. Genauerem Einblick in die Regelmechanismen gewährte das Auffinden des Leptins (Zhang et al., 1994). Leptin wird im Fettgewebe gebildet und hemmt als Teil eines negativen Feedback-Systems via Hypothalamus den Appetit und die Nahrungszufuhr. Gleichzeitig steigert das Hormon aber auch die Energieabgabe über sympathisch vermittelte Mechanismen (Mark et al., 2003).

Inzwischen sind neben einer Vielzahl von Hormonen und Neurotransmittern weitere, vom Fettgewebe produzierte Hormone (Adipokine) sowie deren Rezeptoren beschrieben und in ihrer Funktion untersucht. Hierbei unterscheidet man zwischen anabolen, orexigenen Peptiden, die die Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme fördern und den Energieverbrauch senken und katabolen, anorexigenen Peptiden, die den Energieverbrauch steigern und die Gewichtsabnahme fördern (Hallschmid et al., 2004a).

Wichtige Peptide sind unter anderem:

Anorexigene: Leptin (stimuliert POMC), Insulin, POMC/ α -MSH

Orexigene: Neuropeptid Y, Orexin, Ghrelin (hemmt POMC)

Der Hypothalamus stellt eine Schlüsselrolle als zentraler Regulator der Nahrungsaufnahme dar. Er enthält zwei verschiedene Gruppen von Neuronen, die zum einen Agouti-related Protein und Neuropeptid Y und zum anderen Proopiomelanocorticotropin und das Cocaine-und Amphetamine-related Transcript bilden. Leptin und Insulin zum Beispiel geben Informationen über den Energiehaushalt an den Hypothalamus weiter. Bei positiver Energiebilanz, also Energieüberschuss lösen hohe

Leptin und Insulinspiegel eine Appetithemmung über die Aktivierung von POMC und CART aus. Gleichzeitig werden NPY und AgRP über den zentralen Leptinrezeptor gehemmt. Im Hungerzustand führen niedrige Leptin und Insulinspiegel zu einer Hemmung von POMC und CART sowie zu einer Steigerung von NPY und AgRP, was ein Hungergefühl und eine gesteigerte Nahrungsaufnahme zur Folge hat (siehe Abbildung 1) (Podingbauer und Ekmekcioglu, 2005; Richter, 2006). Die Bedeutung von Proopiomelanocortin und Melanocortinen werden aufgrund besonderer Relevanz gesondert besprochen.

Interessanterweise führen einige anorexigene Hormone neben einer Reduktion der Nahrungsaufnahme auch zu einer Steigerung der sympathisch vermittelten Lipolyse (Haynes et al., 1999). Eine herausragende Rolle für die Fettstoffwechselregulation spielen die Hormone der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse. Hierbei ist der Signalweg über das Proopiomelanocortin (POMC) und dessen Spaltprodukte von Bedeutung.

Zusätzlich haben sich Hinweise auf genetische Faktoren ergeben, die eine Rolle in der Gewichtsregulation spielen. Das individuelle Körpergewicht und die Energiehomöostase werden unter anderem über zentral regulierte „body-weight-setpoints“ bestimmt (Bouchard und Perusse, 1993). Patienten mit Übergewicht weisen demnach einen geregelten aber abnorm hohen „body-weight-setpoint“ auf (Keesey und Hirvonen, 1997).

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass das Körpergewicht durch einen engen Regelkreis mit Feedback-Mechanismus zwischen Hypothalamus und peripherem Fettgewebe reguliert wird. Dieser „crosstalk“ wird hormonell durch oben genannte Adipokine, neural durch das autonome Nervensystem und genetisch durch festgelegte „body-weight-setpoints“ vermittelt. Dadurch wird das Körpergewicht in einem eng regulierten Bereich konstant gehalten, allerdings ist bei adipösen Menschen dieser Bereich zu erhöhten Werten hin verschoben.

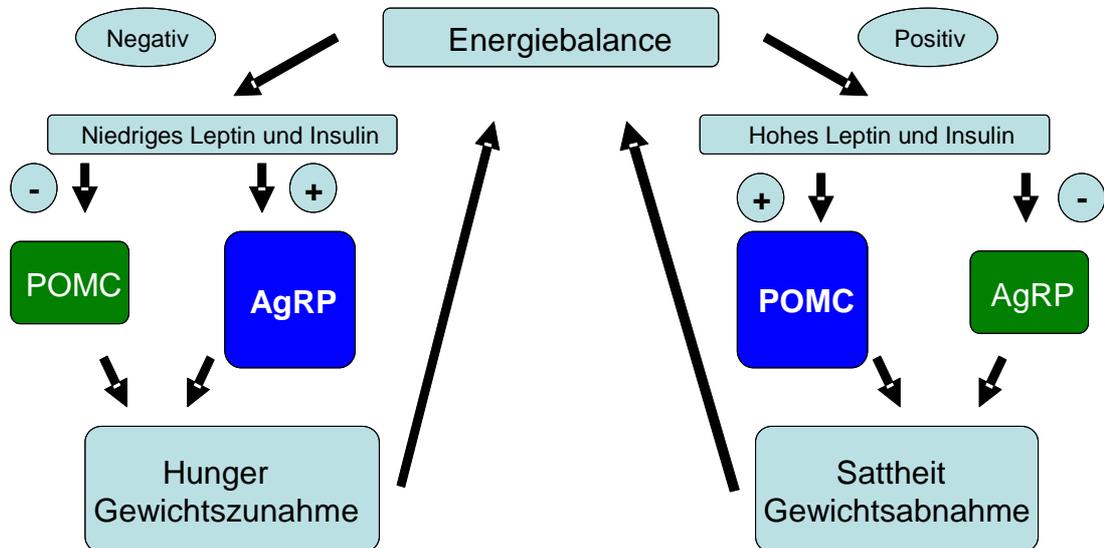


Abbildung 1. Darstellung des Regelkreises zur Aufrechterhaltung der Energiebalance (modifiziert und vereinfacht nach Seeley, 1997).

1.4 Proopiomelanocortin und der „Melanocortin-Rezeptor Pathway“

Melanocortine sind eine Gruppe homologer Peptide, die von der N-terminalen Region des Proopiomelanocortins (POMC) abgespalten werden. Diese Spaltprodukte haben verschiedene Funktionen in der Hautpigmentierung, Schmerzempfindung, Entzündung sowie in der Steroidsynthese in der Nebenniere.

Proopiomelanocortin ist als Polypeptid eine Vorstufe für eine Reihe endokrin aktiver Peptide, die im intermediären Teil der Hypophyse, im Hypothalamus, in der Haut und im Immunsystem gebildet werden. Durch gewebspezifische Endoproteasen (Proconvertase 1 und 2) werden zunächst das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) sowie β -Lipotropin enzymatisch abgespalten, in einem weiteren Schritt folgt die Differenzierung in α -Melanocytenstimulierendes Hormon (α -MSH), Corticotropin like intermediate lobe Peptide (CLIP), β -Endorphin und γ -Lipotropin sowie in β -MSH und γ -Endorphin (Abbildung 2).

Von besonderer Bedeutung für die Regulation des Körpergewichtes ist α -MSH, welches aus einer Sequenz von 13 Aminosäuren besteht, beziehungsweise seine Kernsequenz, das ACTH(4-10), mit sieben Aminosäuren.

Die Aminosäuresequenz des Heptapeptids ACTH(4-10) lautet:

H-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH

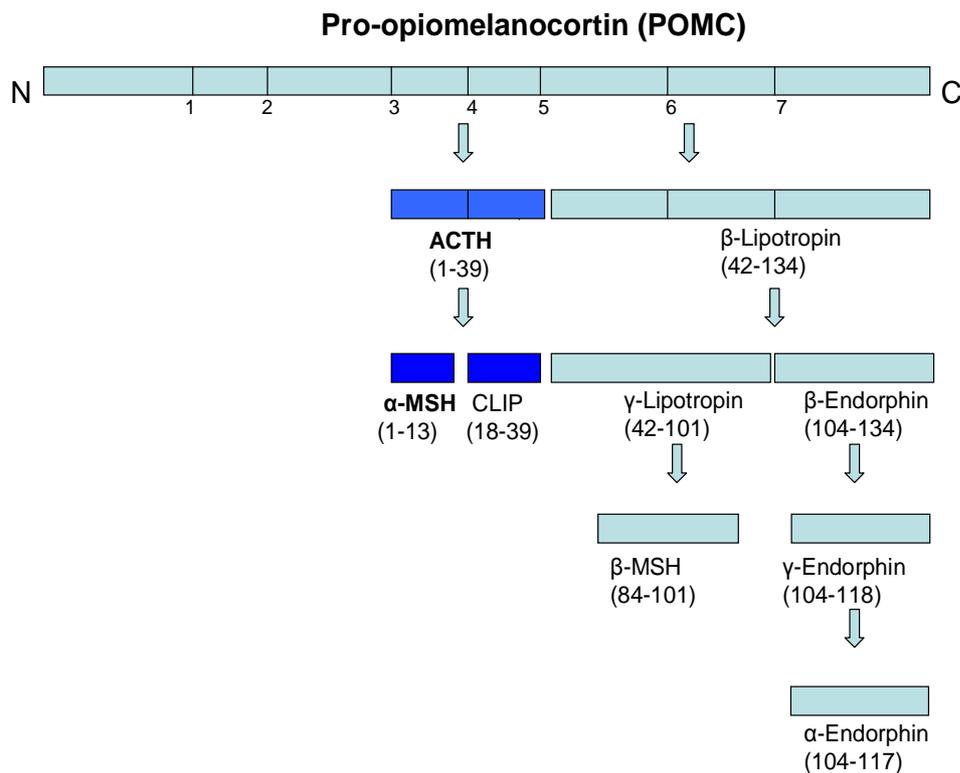


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Generierung von α -MSH aus Proopiomelanocortin (modifiziert nach de Raffin-Sanson et al., 2003).

1.4.1 Melanocortinrezeptoren

Die Effekte der Melanocortine werden über verschiedene Melanocortinrezeptoren (MC1R-MC5R) vermittelt. Dabei unterscheiden sich die Rezeptoren nach Art ihrer Lokalisation und der Bindungsspezifität. In Abhängigkeit von der Fähigkeit, zyklisches Adenosinmonophosphat als second messenger zu induzieren bzw. zu inhibieren, werden Rezeptoragonisten und Rezeptorantagonisten unterteilt.

Bisher wird angenommen, dass der MC3R und MC4R an der Regulation des Körpergewichtes beteiligt ist. Diese beiden Rezeptoren besitzen eine weitreichende Sequenzhomologie (Gantz et al., 1993), eine eindeutig nachgewiesene Beteiligung gelang bisher allerdings nur für den MC4R (Tritos und Maratos-Flier, 1999). Die Tabelle 1 stellt eine Übersicht über die verschiedenen Melanocortinrezeptoren mit ihren Hauptfunktionen, Lokalisationen und Auswirkungen bei Mutationen oder Polymorphismen dar.

Tabelle1: Überblick über Melanocortinrezeptoren, deren Agonisten und Antagonisten, Funktionen und Lokalisationen sowie Mutationen (modifiziert nach Cone, 2006)

(1) (Palmer et al., 2000); (2) (Elias et al., 2000); (3) (Kask et al., 2000; (Chen et al., 2000); (4) (Li et al., 2000); (5) (Van der Ploeg et al., 2002); (6) (Farooqi et al., 2003a, Farooqi et al., 2003b, Farooqi et al., 2000, Martinelli et al., 2011, Mergen et al., 2001, Yeo et al., 1998, Yeo et al., 2003)

Melanocortin-Rezeptor	Lokalisation	Agonisten/ Antagonisten	Funktion	Mutationen / Polymorphismen
MC1R	Melanozyten, Endothelzellen, Neutrophile Granulozyten, Monozyten, Adipozyten	Agonisten: ACTH = α -MSH > β -MSH > γ -MSH Antagonist: Agouti-Protein	Haut- und Haar- pigmentation, Inflammation	Hohe genetische Variabilität, teilweise assoziiert mit rotem Haar, blassem Hautkolorit und Melanom- neigung (1)
MC2R	Nebennierenrinde, Adipozyten	Agonist: ACTH	Glukokortikoid- und Mineralkorti- koidsynthese	Familiäre Glukokortikoid- defizienz durch Rezeptor- mutation (2)
MC3R	Hypothalamus, Thalamus, Hippocampus, Amygdala, Kortex, Plazenta, Magen, Dünndarm, Pankreas, Niere	Agonisten: ACTH= α -MSH= β -MSH= γ -MSH Antagonist: AGRP	Gewichts- regulation, Einfluss auf die Fettverteilung (3) Herzfrequenz, Blutdruck, Natriurese	Mutationen bei Normal- und Überge- wichtigen (4) Bedeutung derzeit nicht geklärt

MC4R	Hypothalamus, Thalamus, Hirnstamm, Kortex	Agonisten: ACTH= α-MSH> β-MSH> γ-MSH Antagonist: AGRP Agouti SHU9119	Energieverbrauch, Appetitregulation, Einfluss auf das Sexualverhalten, und erektile Funktion (5)	Häufigste monogenetische Ursache der Adipositas (6)
MC5R	Exokrine Drüsen, Talgdrüsen, Adipozyten in der Skelettmuskulatur	Agonisten: α-MSH> ACTH = β-MSH> γ-MSH Antagonist: AGRP	Drüsenfunktion, Produktion von Haartalg, Thermoregulation, Produktion von Pheromonen	

1.4.2 Melanocortineres System und der Einfluss auf Energieverbrauch und Nahrungsaufnahme

Verschiedene, im Folgenden beschriebene Tier- und Probandenstudien lassen den Schluss zu, dass der Agonismus beziehungsweise Antagonismus an Melanocortinrezeptoren eine wichtige regulatorische Funktion auf den Fettgewebsmetabolismus und auf das Verhalten bezüglich der Nahrungsaufnahme hat.

Nach intracerebroventrikulärer (icv) Applikation von α-MSH zeigt sich im Tierversuch eine Veränderung des Fressverhaltens: Der Zeitraum von Beginn bis zur Beendigung einer Mahlzeit ist verkürzt, und die Nahrungsmenge ist verringert (Vergoni et al., 2000). Bei Überexpression von Agouti-Protein, einem MC4R-Antagonisten, zeigt sich in tierexperimentellen Studien ein adipöser Phänotyp (Graham et al., 1997, Ollmann et al., 1997).

In ähnlicher Weise zeigt sich bei MC4R-knock-out-Mäusen ein adipöser Phänotyp, Hyperphagie, Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und eine Insulinresistenz (Huszar et al., 1997). Umgekehrt führt die Behandlung von adipösen POMC-Knock-out-Mäusen mit α-MSH innerhalb von zwei Wochen zu einem signifikanten Gewichtsverlust von bis zu 40% des Ausgangsgewichtes (Yaswen et al., 1999).

Auch andere gewichtsregulierende Mechanismen scheinen einen Einfluss auf das melanocortinerge System zu besitzen. So stellt Melanin-concentrating-hormone (MCH), welches über die Bindung an MCH-1 und MCH-2 Rezeptoren eine orexigene Wirkung erzielt, einen funktionellen Antagonisten von α -MSH dar, ohne die Bindung von α -MSH an den MC3 oder MC4R zu blockieren (Chung et al., 2011, Ludwig et al., 1998, Qu et al., 1996).

Daneben ist auch das Wechselspiel von Insulin und Leptin sowie AgRP und Neuropeptid Y mit dem melanocortinergen System von großer Bedeutung. Wird Insulin zentral (intranasal) über einen längeren Zeitraum verabreicht, kommt es bei männlichen Probanden zu einer Gewichtsabnahme (Hallschmid et al., 2004b).

In anderen tierexperimentellen Versuchen konnte gezeigt werden, dass erhöhte Leptin- und erhöhte zentrale Insulinspiegel die Nahrungsaufnahme senken und eine Gewichtszunahme verhindern, indem sie unter anderem die Expression für POMC im Nucleus arcuatus sowie für „Cocain- und Amphetamin regulierendes Transkript“ (CART) induzieren (Mizuno et al., 1998).

Die durch Leptin induzierte verringerte Nahrungsaufnahme wird über die Stimulation von POMC exprimierenden Neuronen des Nucleus arcuatus und einer daraus resultierenden Freisetzung von α -MSH vermittelt (Benoit et al., 2002, Seeley et al., 1997).

Abfallende Leptinspiegel während prolongierter Hungerphasen führen zu einer verminderten Bildung von α -MSH und zu einem Anstieg von AgRP und Neuropeptid Y. Neuropeptid Y ist ein starker Stimulator des Hungerzentrums. AgRP hemmt die Wirkung von α -MSH an dem MC4R, was zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme führt (Reizes et al., 2003).

Auch in Probandenstudien lässt sich dieses Prinzip nachvollziehen. So führt die längerfristige intranasale Gabe des MC4R Agonisten ACTH(4-10) zu einer signifikanten Reduktion des Körpergewichtes sowie des Körperfettes (Hallschmid et al., 2004a).

Bisher ging man davon aus, dass der gewichtsreduzierende Effekt der Melanocortine vor allem auf einer Minderung der Nahrungsaufnahme beruht. Allerdings gibt es zunehmend

Hinweise darauf, dass auch andere Mechanismen eine Rolle spielen, und dass ein Gewichtsverlust zumindest auch teilweise unabhängig von der Nahrungsaufnahme ist; z.B. konnte nach peripherer Applikation von Melanotan II, einem synthetischen MC4R-Agonisten, eine Reduktion spezieller Fettgewebekompartimente (subkutanes und viszerales Fettgewebe) dargestellt werden (Strader et al., 2007).

Der bedeutende Einfluss der Melanocortine auf das sympathische Nervensystem im Zusammenhang mit der Beeinflussung des Energieverbrauches wird gesondert dargelegt.

1.4.3 Einfluss von Melanocortinagonisten auf die Lipolyse

Neuropeptide mit einer Schlüsselrolle in der Appetitregulation, wie α -MSH, Melanin-concentrating-Hormon und Neuropeptid Y sind bekannt dafür, dass sie den Energiehaushalt über zentrale Wege beeinflussen. Allerdings gibt es auch Hinweise auf eine direkte periphere Beeinflussung der Lipolyse in Zellen, z.B. den Adipozyten.

An isolierten Adipozyten hemmen orexigene Neuropeptide wie NPY die Triglyceridfreisetzung, während anorexigene Peptide wie α -MSH oder Melanotan II lipolytische Effekte erzielen (Bradley et al., 2005). Agouti-Protein, als MCR-Antagonist, bewirkt ähnlich wie NPY eine Hemmung der Lipolyse an isolierten humanen Adipozyten (Moussa und Claycombe, 1999, Xue et al., 1998).

Neben der peripheren Wirkung der Neuropeptide ist ihr Effekt auf zentrale Gewichtsregulationsmechanismen von großer Bedeutung. Intracerebroventrikulär verabreichte Melanocortinagonisten führen im Tierversuch zu einer Gewichtsreduktion und zu einer gesteigerten Expression lipogenese-fördernder Gene (Nogueiras et al., 2007). Außerdem steigert die icv Gabe von Melanotan II die mRNA-Expression für Insulin-induzierendes-Gen 2 (INSIG2) im weißen Fettgewebe, welches die Aktivierung der Cholesterolsynthese hemmt. Die längere Verabreichung von Melanotan II erhöht die mRNA Expression der „adipose-triacylglycerol-lipase“, welche ein Markerenzym für den Katabolismus von Speicherfett darstellt (Nogueiras et al., 2007).

1.4.4 Melanocortinerges System und das sympathische Nervensystem

Neben den Einflüssen des POMC-Systems, vor allem der Melanocortine, auf die Regulation des Körpergewichtes, den Energiehaushalt und die Lipolyse wurden auch sympathoexzitorische und kardiovaskuläre Effekte beschrieben. Diese Tatsache lässt vermuten, dass α -MSH einen direkten Einfluss auf die sympathische Nervenaktivität hat. Eine Überexpression von α -MSH bei Mäusen zeigt einen signifikant höheren mittleren arteriellen Blutdruck (Rinne et al., 2008). Nach kontinuierlicher icv Gabe von Melanotan II kommt es einerseits zu einer kurzfristigen Verringerung der Nahrungsaufnahme, andererseits zu einem Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes und zu einer Erhöhung der Herzfrequenz als Zeichen der Sympathoexzitation. Da sich diese Effekte nach medikamentöser Blockade der adrenergen Rezeptoren durch Terazosin und Propranolol komplett unterdrücken lassen, ist davon auszugehen, dass dieser kardiovaskuläre Einfluss über eine Aktivierung des adrenergen Systems vermittelt wird (Kuo et al., 2004). Diese Annahme wird durch jüngste Studien belegt, die zeigen, dass Menschen mit funktionslosem MCR4 im Vergleich zu Probanden mit funktionstüchtigem MCR4 eine deutlich geringere Prävalenz für arterielle Hypertonie aufweisen, niedrigere systolische und diastolische Ruhe-Blutdruckwerte, einen geringeren Herzfrequenzanstieg während der Aufwachphase und eine geringere Noradrenalinausscheidung im 24-Stunden-Urin haben (Greenfield et al., 2009).

Weitere Interaktionen zwischen dem sympathischen Nervensystem und dem melanocortinergen System lassen sich am braunen Fettgewebe zeigen. Nach der icv Applikation von α -MSH konnte eine Temperaturerhöhung im braunen Fettgewebe registriert werden (Yasuda et al., 2004).

Die icv Gabe von Melanotan II führt zu einem sympathoexzitorischen Effekt im braunen Fettgewebe und in der renalen sympathischen Nervenaktivität (RSNA). Auch die sympathoexzitorischen Effekte von Leptin auf die RSNA werden hauptsächlich über Melanocortinrezeptoren vermittelt, da ein zentral verabreichter Melanocortinrezeptorantagonist die leptininduzierte Sympathoexzitation unterdrückt (Haynes et al., 1999, Rahmouni et al., 2003). Allerdings scheint der MC4R nicht

ausschließlich notwendig für die Leptin-vermittelte Kontrolle der RSNA (Correia et al., 2002, Rahmouni et al., 2002).

Die Kommunikation zwischen weißem Fettgewebe (WAT) als wichtiger Energiespeicher und den zentralen Regelsystemen im Hypothalamus erfolgt über den Blutweg, höchstwahrscheinlich aber auch über sympathische Efferenzen zu den Adipozyten (Dodt et al., 1999). Vom Fettgewebe sezernierte Hormone wie z.B. Leptin, sind endokrine Afferenzen die eine Rückmeldung über noch vorhandene Energiereserven des WAT geben. Die Efferenzen des sympathischen Systems vom Gehirn zum weißen Fettgewebe enthalten Zellen, die die mRNA für den MC4-Rezeptor exprimieren (Song et al., 2005). Nach zentraler Gabe von Melanotan II lässt sich die sympathische Nervenaktivität im weißen Fettgewebe steigern und durch Melanocortin-Antagonisten komplett unterdrücken (Nogueiras et al., 2007).

Diese Tatsachen unterstreichen unsere Hypothese, dass die Lipidmobilisation im weißen Fettgewebe zentral durch Melanocortine und konsekutiv durch das sympathische Nervensystem reguliert wird.

1.4.5 Einfluss der Melanocortine auf den Barorezeptorreflex

Der Einfluss von Proopiomelanocortin, bzw. von Melanocortinen, auf die autonome Regulation des kardiovaskulären Systems konnte in mehreren Studien gezeigt werden. Vor allem durch Beobachtung des Barorezeptorreflexes können die Wirkungen der Melanocortine dargestellt werden.

Tierexperimentell wurden im Barorezeptorareal des Hirnstammes ACTH, α -MSH und Beta-Endorphin nachgewiesen. Die Bahnen zwischen den Neuropeptid enthaltenden Zellen im Tractus solitarius führen bis zur ventrolateralen Medulla oblongata und innervieren so vasomotorische beziehungsweise vasodepressorische Areale (Palkovits et al., 1987).

Eine α -MSH- und γ -MSH-Überexpression bei Mäusen führt zu einer gesteigerten Barorezeptorreflexaktivität, einer höheren Barorezeptoreffektivität und zu häufigeren Baroreflexabläufen (Rinne et al., 2008).

1.5 Intranasale Applikation von MSH/ACTH(4-10)

Die Entdeckung von Hormonen mit gewichtsregulierender, anorexigener Wirkung im zentralen Nervensystem lässt es möglich erscheinen, die Fettleibigkeit durch Gabe dieser Hormone oder ihrer Derivate zu behandeln. Dazu müsste die entsprechende Substanz auch den Wirkort im Gehirn erreichen. Während sich im Tierversuch zentrale Wirkungen von Substanzen durch intraventrikuläre Injektionen untersuchen lassen, ist die Applikation von Hormonen, die zentralnervöse Wirkungen entfalten sollen beim Menschen problematisch. Zur Überwindung der Blut-Hirnschranke sind teilweise sehr hohe Arzneimitteldosierungen notwendig, was mit entsprechend ausgeprägten Nebenwirkungen einhergehen kann.

Eine Möglichkeit, den Systemkreislauf und die Blut-Hirnschranke zu umgehen, stellt die intranasale Applikation dar. Dabei gibt es unterschiedliche Wege, Stoffe über die Regio olfactoria aufzunehmen (Illum, 2000).

Die Stoffe können parazellulär durch verschiedene Zellverbindungen, transzellulär durch die Stützzellen des olfaktorischen Epithels in das ZNS gelangen oder auf einem transzellulären axonalen Weg aktiv über die Riechneurone bis zum Bulbus olfactorius transportiert werden. Die Moleküle gelangen hierbei über den Mechanismus der Pinozytose oder Endozytose in die neuronalen Zellen, entlang der Axone zur Lamina cribrosa und zum Bulbus olfactorius. Der Prozess kann bis zu 24 Stunden dauern (Kristensson und Olsson, 1971). In unserem Fall ist letztgenannter Transport allerdings von untergeordneter Bedeutung, da MSH/ACTH(4-10) seine höchste Konzentration im Liquor wesentlich früher erreicht, als auf rein axonalem Transportweg möglich wäre (Born et al., 2002b).

In Probandenstudien erfolgte eine Messung der Liquorkonzentration vor und bis 80 Minuten nach intranasaler Applikation von MSH/ACTH(4-10). MSH/ACTH(4-10) zeigte

einen signifikanten Konzentrationsanstieg im Liquor, dessen Maximum ca. 30 Minuten nach intranasaler Applikation erreicht wurde (Born et al., 2002b).

Daher erscheint der parazelluläre Transportweg in unseren Versuchen der Wahrscheinlichere. Hierbei diffundieren die Peptide durch interzelluläre Poren im Epithel der Regio olfactoria in den Subarachnoidalraum und gelangen somit wesentlich schneller in das Gehirn.

Die Transportfähigkeit eines Moleküls ist von Substanzgröße, Molekulargewicht, Lipophilie und Ionisation abhängig. Lipophile Moleküle werden schnell und effektiv von der Nasenschleimhaut absorbiert und gelangen in den systemischen Kreislauf. So erreichen sie eine Bioverfügbarkeit von bis zu 100% (Illum, 2003). Hydrophile Moleküle dagegen gelangen auf sehr langsamem Weg durch die Nasenschleimhaut in den Systemkreislauf (Illum, 2000). Zusammenfassend konnten Voruntersuchungen zeigen, dass die intranasale Applikation von α -MSH einen Weg darstellt, das Peptid in das Zentralnervensystem zu transportieren.

1.6 Allgemeine Grundlagen der Mikroneurographie

Die Mikroneurographie ist eine spezifische, minimal invasive Methode zur Erfassung intraneuraler, efferenter sympathischer Nervenaktivität zum Muskelgefäßbett (muskuläre sympathische Nervenaktivität, MSNA) und zum Gefäßbett der Haut und ihren Anhangsorganen, Schweißdrüsen und der piloerectorischen Muskulatur (skin sympathetic nerve activity, SSNA) (Hagbarth und Valbo et.al.).

Es werden Potenzialänderungen einzelner, meist jedoch mehrerer sympathischer Neurone in einem oberflächlich gelegenen Nerven, wie z.B. dem N.medianus, N.cutaneus femoris lateralis und dem N.peroneus superficialis gegen eine Referenzelektrode abgeleitet. Die Entladung der Neurone der MSNA erfolgt synchronisiert zum Herzzyklus in so genannten Bursts. Die Amplitude dieser Bursts ist von der Anzahl der aktivierten Neuronen abhängig.

In gemischten Extremitätennerven, wie dem N.peroneus, liegen sensorische, motorische und die verschiedenen vegetativen Qualitäten (MSNA und SSNA) nebeneinander vor.

Deshalb ist die Differenzierung der MSNA von der SSNA für die Durchführung des Experimentes wichtig.

Die SSNA führt insbesondere vasokonstriktorische Impulse zu den Hautgefäßen, sowie sudomotorische Impulse. Charakteristisch für die SSNA-Ableitung sind Bursts von unterschiedlicher Dauer und Amplitude, deren Entladungsrate im Gegensatz zu den MSNA-Bursts durch emotionale Beeinflussung wie Berührung, Schreckreiz, mentalem Stress und thermalen Reizen gesteigert werden kann. Klinisch wird die anhaltende vasokonstriktorische und sudomotorische Aktivität als „kalter Schweiß“ wahrgenommen (Wallin und Fagius, 1988).

Bei Positionierung der Elektrode in einem Hautfaszikel kommt es nach elektrischer Stimulation zu Parästhesien in dem Bereich. Das Bestreichen der innervierten Hautareale führt dabei durch Stimulation sensorischer Afferenzen, die zu einem Endorgan führen, zu deutlich wahrnehmbaren akustischen Signalen im Verstärker.

Bei korrekter Positionierung der MSNA-Elektrode in einem muskulären sympathischen Faszikel treten keine Hautsignale auf. Hier werden Signale durch Dehnung des innervierten Muskelbauches bzw. der Muskelsehne provoziert. Das wird dadurch erklärt, dass eine direkte Nachbarschaft der muskulären, sympathischen Faszikel zu den A α -Fasern aus den Dehnungsrezeptoren (Muskelspindeln) besteht. MSNA vermittelt hauptsächlich die Kontraktion der Gefäßmuskulatur und reguliert dadurch den peripheren Widerstand (Delius et al., 1972).

Die MSNA ist genetisch determiniert, und zwischen einzelnen Individuen sehr unterschiedlich, so dass die Ableitung von 10 bis zu 90 Bursts pro 100 Herzschläge variieren kann (Sundlof und Wallin, 1977). Dabei bleibt sie innerhalb einer Person relativ konstant. Während die SSNA unabhängig vom Herzzyklus ist, ist die MSNA pulssynchron und wird stark durch den Barorezeptorreflex beeinflusst.

1.6.1 MSNA Regulation durch Barorezeptoren

Im Karotissinus und im Aortenbogen befinden sich die funktionell wichtigsten Barorezeptorareale. In Abhängigkeit von der Höhe des transmuralen Drucks wird hier

durch Dehnung der Gefäßwände eine Erregung erzeugt. Ein Blutdruckanstieg hat eine Erhöhung der Impulsrate der Barorezeptorafferenzen zur Folge und bewirkt über einen zentralen Regelkreis eine Erregung im Nucleus tractus solitarius. Diese Neurone wirken hemmend auf die rostroventrolaterale Medulla, so dass die Aktivität in den sympathischen Neuronen zu den Widerstandsgefäßen und zum Herzen abnimmt. Umgekehrt bewirkt ein Blutdruckabfall über die Barorezeptorschleife eine Sympathoexzitation (Gaehtgens, 2006).

1.7 Allgemeine Grundlagen der Mikro dialyse

Die Mikro dialyse ermöglicht eine direkte Überwachung des Gewebestoffwechsels in unterschiedlichen Geweben in vivo. Diese Methode wurde 1974 erstmals beschrieben und fortan weiterentwickelt (Ungerstedt und Pycock, 1974). Zunächst wurde die Mikro dialyse zur intrakraniellen Messung von Neurotransmittern bei Ratten eingesetzt (Benveniste, 1989, Ungerstedt und Pycock, 1974), später auch in anderen Geweben. 1987 wurde so zum ersten Mal das subkutane Fettgewebe beim Menschen untersucht (Lonroth et al., 1989). Mittlerweile ist diese Methode durch zahlreiche wissenschaftliche Studien etabliert (Bolinder et al., 1989). Vor allem subkutanes Fettgewebe, Muskulatur und zentrales Nervensystem, aber auch Herzmuskulatur und Lungengewebe wurden untersucht (Bahlmann et al., 2003, Bahlmann et al., 2002, Dahyot et al., 2006, Poling et al., 2007, Zeitlinger et al., 2005).

Das Prinzip der Mikro dialyse basiert auf einem Stoffaustausch zwischen zwei Flüssigkeiten unterschiedlicher Stoffkonzentration entlang einer semipermeablen Membran. Bei dem Mikro dialysekatheter handelt es sich um einen speziellen doppellumigen Katheter, der in das zu untersuchende Gewebe eingeführt wird und so kontinuierlich interstitielle Flüssigkeit gewinnt. Dabei wird der Katheter über eine am zuführenden Schenkel angebrachte Präzisionspumpe (CMA 107/CMA Microdialysis, Solna, Schweden) kontinuierlich perfundiert.

Die Mikro dialysesonde wird in das Gewebe eingebracht und imitiert eine Blutkapillare. So kann man Rückschlüsse auf den funktionellen Zustand der Zellen gewinnen. Dabei wird

das innere Lumen der Mikrodialysesonde mit einer Perfusionslösung, welche frei von zu bestimmenden Parametern ist, mit einer an der Präzisionspumpe einstellbaren variablen Flussrate durchströmt. Entlang des Konzentrationsgefälles zwischen Extrazellularraum und Perfusionsflüssigkeit diffundieren lösliche, im Interstitium vorliegende Moleküle in die Perfusionslösung. Dabei befindet sich an der Spitze des Dialysekatheters eine Membran mit definierter Länge und Porengröße, so dass nur Moleküle eines bestimmten Durchmessers durch diese Membran diffundieren können.

Weiter gelangt das interstitielle Dialysat über den abführenden Schenkel des Katheters in spezielle Auffangbehälter (Mikrovials).

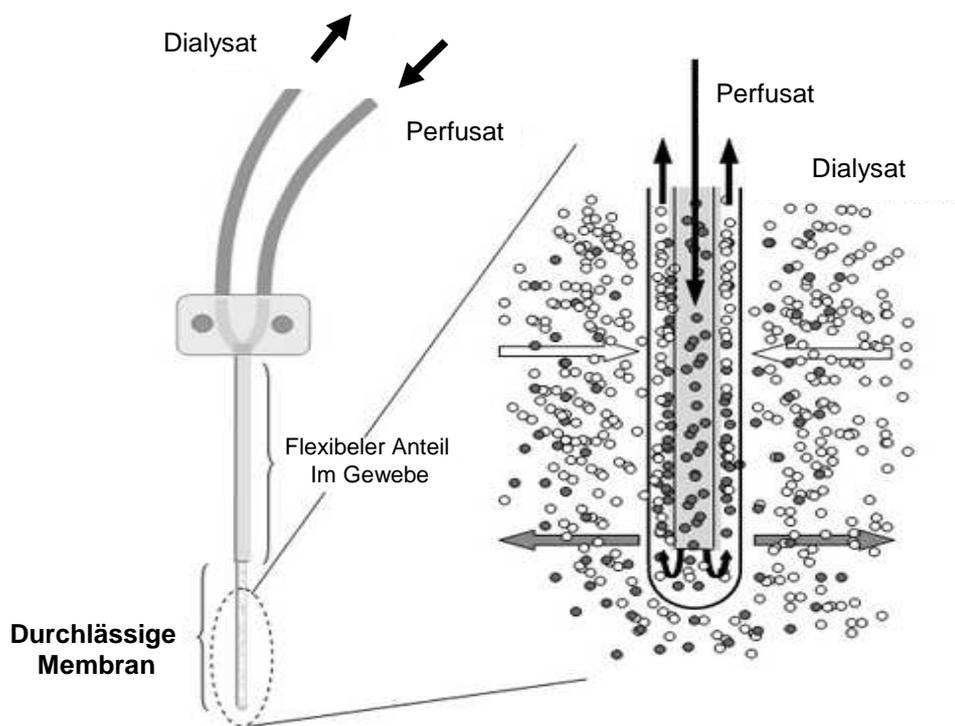


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Mikrodialyse (modifiziert nach Chaurasia et al., 2007)

Bei der Messung der Substratkonzentrationen im Dialysat ist zu beachten, dass sich abhängig von den Versuchsbedingungen unterschiedliche Wiederfindungsraten (Recovery) der Moleküle des Interstitiums im Dialysat ergeben. Man unterscheidet die absolute Recovery als absolute Menge der Metabolite von der relativen Recovery als

prozentualen Anteil der Metabolite im Dialysat im Verhältnis zum Interstitium (Klaus et al., 2004).

Die ermittelten Konzentrationen im Dialysat sind von folgenden Einflüssen abhängig:

1. Flussgeschwindigkeit der Perfusionslösung
2. Länge der Sondenmembran
3. Eigenschaft der Mikrodialysemembran
4. Diffusionskoeffizient des Gewebes
5. Durchblutung des Gewebes

1.8 Allgemeine Grundlagen der Laser Doppler Flowmetrie

Die Laser Doppler Flowmetrie (LDF) bietet die Möglichkeit der nicht-invasiven Messung der kapillären Perfusion. Diese Methode wurde 1977 erstmals klinisch angewendet (Holloway, Jr. und Watkins, 1977). Dabei wird über eine Faseroptik ein Laserstrahl mit niedriger Energie appliziert, der im Zielgewebe gebrochen und absorbiert wird. Trifft der Laserstrahl auf sich bewegende Blutkörperchen, wird der Strahl reflektiert und gemäß des Doppler-Prinzips in seiner Frequenz verändert. Die Frequenz ändert sich proportional zu der Geschwindigkeit der Teilchen (Braun'sche Molekularbewegung). Über einen optischen Detektor können die reflektierten Strahlen aufgenommen, in ein elektronisches Signal umgewandelt und analysiert werden.

Die so erhaltenen Werte werden in willkürlich festgelegte Einheiten, Perfusion Units (PU), angegeben. Um die Vergleichbarkeit der Werte zu gewährleisten, wird die Sonde in einer bestimmten Eichlösung gegen die Braun'sche Molekularbewegung kalibriert.

Die LDF kann sowohl nicht-invasiv über auf die Haut aufgeklebten Sonden, als auch minimal-invasiv, durch in das Fettgewebe eingebrachte Sonden durchgeführt werden. In Echtzeit wird so die mikrovaskuläre Perfusion gemessen. In einer Studie an normalgewichtigen und übergewichtigen Probanden konnten so Einflüsse des sympathischen Nervensystems auf den subkutanen Blutfluss dargestellt und reproduziert werden (Wellhoner et al., 2006).

Von klinischer Bedeutung ist die LDF bisher vor allem in den Bereichen der plastischen Chirurgie und Dermatologie zur Bestimmung und Durchblutung in transplantiertem und operiertem Gewebe und in Untersuchungen der peripheren Durchblutung (Choi und Bennett, 2003, Petschke et al., 2006, Zografos et al., 1992).

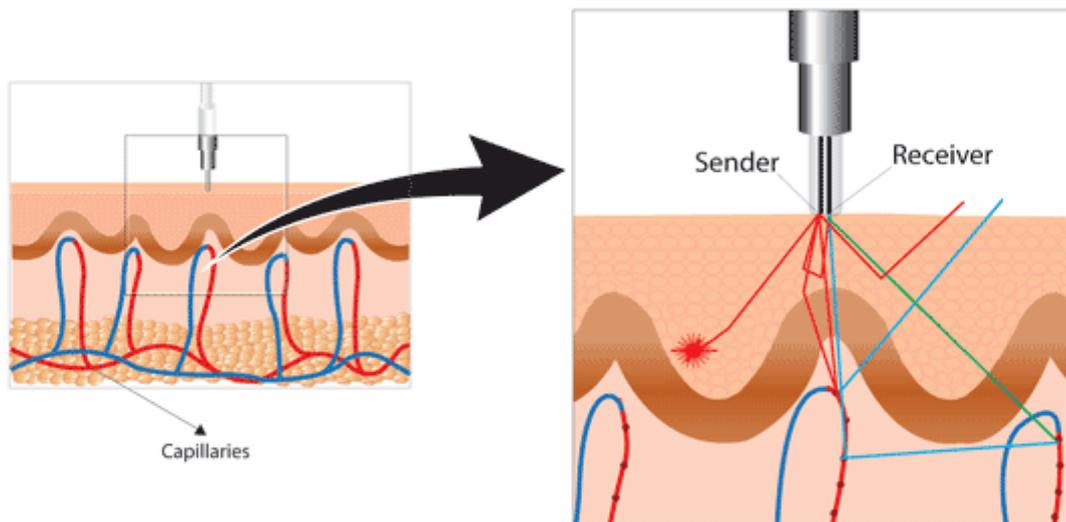


Abbildung 4. Schematische Darstellung des Prinzips der Laser Doppler Flowmetrie (Perimed Instruments).

2 Fragestellung

Derzeitige Studien beschreiben einen gewichtsreduzierenden Effekt des MC4R-Agonisten α -MSH im Tierversuch und bei normalgewichtigen Probanden. Dieser Effekt wurde vor allem durch Inappetenz erklärt. Allerdings müssen nach neueren Studien auch andere gewichtsreduzierende Mechanismen in Betracht gezogen werden.

Im Hinblick darauf sollte in dieser Studie der Effekt von intranasal appliziertem MSH/ACTH(4-10) auf die Lipolyse im peripheren Muskel- und Fettgewebe sowie auf die sympathische Nervenaktivität in Ruhe und während der medikamentösen Barorezeptorreflextestung untersucht werden.

Folgende Fragestellungen sollten untersucht werden:

1. Induziert intranasal appliziertes MSH/ACTH(4-10) die Lipolyse im Muskel- und Fettgewebe?
2. Führt die intranasale Applikation von MSH/ACTH(4-10) zu einer Steigerung der mukulären sympathischen Nervenaktivität?
3. Führt die intranasale Applikation von MSH/ACTH(4-10) zu einer erhöhten Barorezeptorreflexempfindlichkeit?

3 Material und Methoden

Die vorliegende Studie wurde an der Medizinischen Klinik I der Universität zu Lübeck im Neurophysiologischen Labor durchgeführt.

Die Studie wurde der Ethikkommission der Universität zu Lübeck vorgestellt und von dieser als ethisch unbedenklich eingestuft (Aktenzeichen 04-006). Vor der Versuchsteilnahme erfolgte eine schriftliche und mündliche Aufklärung über den Studienablauf sowie über mögliche Risiken einer Teilnahme. Diese wurde in Form einer schriftlichen Einverständniserklärung protokolliert (siehe Anhang).

3.1 Studiendesign

Das Design der Studie ist eine doppelt verblindete, placebokontrollierte Fall-Kontroll-Studie, welche männliche, gesunde Probanden einschließt. Je Proband erfolgten zwei Versuchsvormittage. Pro Versuchstag verabreichten wir intranasal als Nasenspray zum einen Placebo, in Form von 5ml destilliertem Wasser und zum anderen 10mg MSH/ACTH(4-10), gelöst in 5ml destilliertem Wasser. Die Sprays konnten weder durch den Geruch und Geschmack noch durch die Farbzusammensetzung unterschieden werden.

3.2 Versuchsablauf

An jedem Versuchstag fanden sich die Probanden um 08:00Uhr im Neurophysiologischen Labor ein. Dann begannen wir mit der Anlage der EKG-Elektroden, der Applikation der Venenverweilkanüle (Venflon 18GA, 0,98IN) sowie der Mikrodialysekatheter und der Mikroneurographiesonde. Danach erfolgte eine 30minütige Ruhephase um eine ruhige und gute Ableitung zu erhalten und die Geräte zu equilibrieren. Um Ausgangswerte zu erhalten, haben wir 15 Minuten vor der intranasalen Gabe der Substanzen über die Venenverweilkanüle Blut für die Bestimmung von ACTH, Insulin, Leptin, freien Fettsäuren, Glucose, Glycerol, Laktat, Adiponektin, BNP, Cortisol und Katecholaminen sowie Mikrodialysat zur Bestimmung von Glycerol, Glucose, Pyruvat und Laktat entnommen. Während des weiteren Versuchablaufs überwachten wir mittels Mikrodialyse die lokalen

Stoffwechselprozesse im subkutanen, abdominellen Fettgewebe sowie in der Unterarmmuskulatur. Das gewonnene Dialysat wurde in Mikrovials aufgefangen. Diese Vials wurden alle 15 Minuten ausgewechselt, verschlossen und bei -30°C bis zur Bestimmung der Metabolite tiefgefroren. Blutentnahmen erfolgten in einem halbstündlichen Intervall. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme zentrifugiert und eingefroren. Zudem erfolgten mikroneurographische Messungen zur Bestimmung der sympathischen Nervenaktivität zum Gefäßmuskelbett (MSNA) und die medikamentöse Barorezeptorreflextestung.

Während des Versuches erfolgte die kontinuierliche Aufzeichnung von Herzfrequenz, Blutdruck, Atemexkursion und Laser Doppler Flow vom subkutanen Fett und der Haut. Zwischen den einzelnen Versuchstagen wurde ein versuchsfreier Zeitraum von mindestens drei Wochen eingehalten.

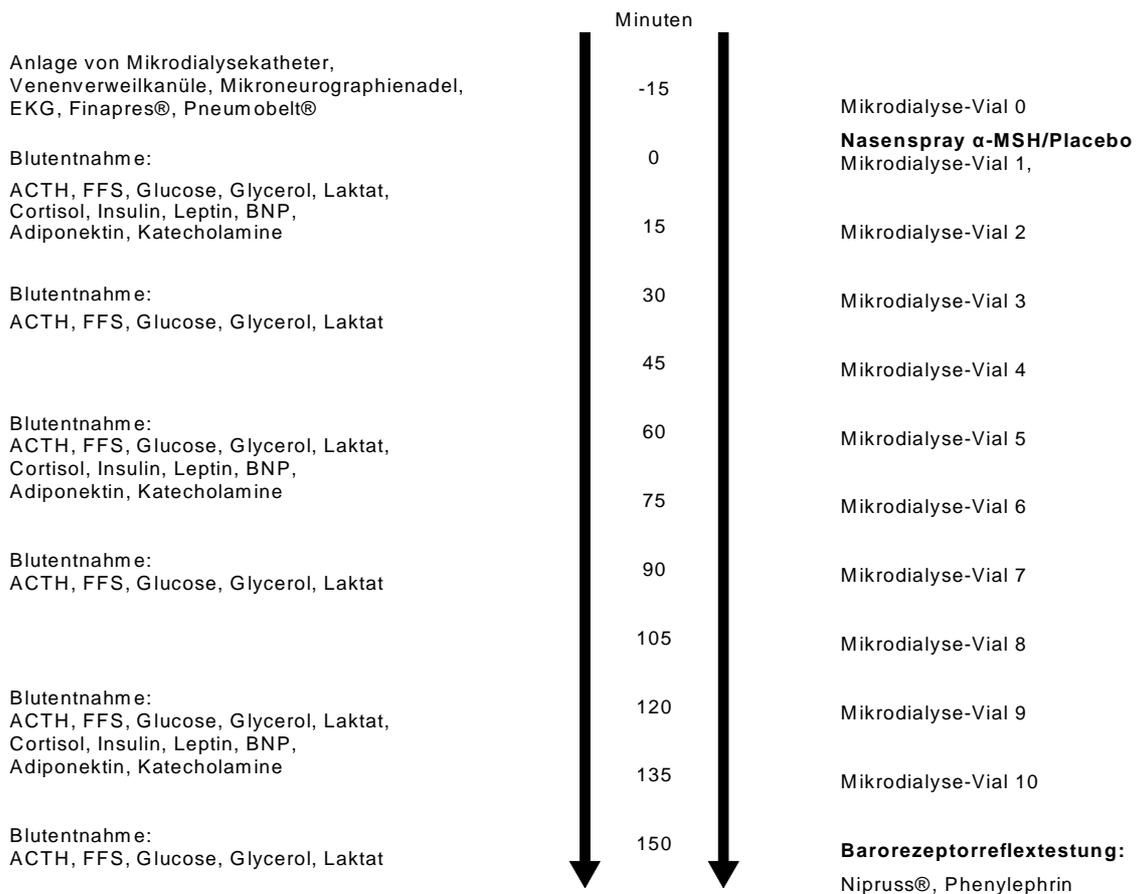


Abbildung 5. Schematische Darstellung des Versuchsablaufes.

3.3 Probanden

An der Studie nahmen zehn männliche, gesunde Nichtraucher ohne dauerhafte oder gegenwärtige medikamentöse Behandlung teil.

Weitere Voraussetzungen der Probanden für die Teilnahme an der Studie waren ein Body-Mass-Index zwischen 20 und 25, sowie die Zugehörigkeit der Altersgruppe von 18 bis 40 Jahren. Die Probanden wurden aufgefordert am Versuchstag nüchtern zu erscheinen. Außerdem wurden sie darauf hingewiesen, am Vortag der Versuche keine sportliche Tätigkeit auszuüben und auf alkoholische oder koffeinhaltige Getränke zu verzichten. Zu Beginn der Versuche wurden die Patienten gewogen, Körpergröße und Body-Mass-Index (BMI) bestimmt sowie die „waist-to-hip-ratio“ gemessen.

3.4 Apparative Messanordnungen

3.4.1 Mikroneurographie

3.4.1.1 Technische Grundlagen

Die Ableitung der MSNA erfolgte durch feine, lackisolierte, konisch zulaufende Wolfram-Mikroelektroden, die einen Schaftdurchmesser von 0,2mm und eine geätzte, wenige Mikrometer dünne, nicht isolierte Spitze aufweisen. Eine weitere, subkutan gelegene Elektrode diente als Referenz. Vor Gebrauch der Elektroden wurden diese sterilisiert und die Ableitelektrode mikroskopisch auf Schäden, wie z.B. Widerhaken kontrolliert, um Nervenschädigungen auszuschließen.

3.4.1.2 Durchführung der Mikroneurographie

Wir führten die Untersuchung in für den Probanden entspannter Rückenlage mit leicht erhobenem Oberkörper durch. Das zu untersuchende Bein lagerten wir dabei in einer speziell angefertigten Schaumstoffschiene. Die Lage des N.peroneus, unterhalb des Fibulaköpfchens, wurde palpatorisch bestimmt. Zur exakten Lokalisation des Nervs war eine transdermale elektrische Stimulation mit Hilfe eines Nervenstimulators notwendig (Model S48, Grass Instrument Company, Quincy, USA). Hierbei betrug die eingesetzte Spannung 30-40 Volt über eine Reizdauer von 0,01ms bei einer Stimulationsfrequenz von

1Hz. Bei der Stimulation zeigten sich deutliche, unwillkürliche und impulssynchrone Kontraktionen der Unterschenkelmuskulatur. So ließ sich der Verlauf des N. peroneus circa fünf Zentimeter unter der Haut verfolgen und markieren.

Folgend platzierten wir die Referenzelektrode in einem Abstand von 3cm zum Nervenverlauf im Subkutangewebe und die Ableitelektrode durch die Haut in die Richtung des N. peroneus. Hierbei erfolgte eine weitere elektrische Nervenstimulation mit einer Spannung von 1-3 Volt über 0,01ms und einer Frequenz von 1Hz.

Die Nähe der Elektrode zum N. peroneus konnte durch den Versuchsleiter am Ausmaß der resultierenden Muskelkontraktionen im M. tibialis anterior (Zehenstrecker) oder der Peroneusgruppe (Wadenbeinmuskulatur) abgeschätzt werden. Dann reduzierten wir die Spannung schrittweise und änderten die Lage der Elektrode geringfügig bis die Spannung weniger als 1,5 Volt, bei noch deutlicher Muskelkontraktion, betrug und der Proband keine Parästhesien verspürte. Die Ableitelektrode war mit einem Verstärkersystem verbunden, welches aus einem Vorverstärker und einem Hauptverstärker bestand. Dies ermöglichte eine Verstärkung, eine Filterung und eine Diskrimination des gewonnenen Signals. So konnten bei korrekter Lage der Elektrode, intraneural in direkter Nähe der sympathischen Nervenfasern die Entladungen des Sympathikus in Form von Summenpotentialen (Bursts) abgeleitet werden. Zur optischen und akustischen Darstellung der Ableitung dienten ein Verstärker mit Lautsprecher sowie ein Computerbildschirm.

Für die Beurteilung der richtigen Elektrodenlage und somit korrekt abgeleiteten Nervenaktivität galten verschiedene Kriterien:

Zum einen haben wir die sichere Lage im Nervenfaszikel durch die Reizung der Dehnungsrezeptoren (Beklopfen der Unterschenkelstreckmuskulatur) und damit einhergehender Burstinduktion dargestellt. Zum anderen führten wir eine Sympathikusaktivierung durch ein Apnoemanöver durch. Dabei stellt einerseits die beginnende Hyperkapnie einen aktivierenden Stimulus dar, andererseits führen der verminderte venöse Rückstrom zum Herzen und die Senkung des arteriellen Blutdruckes während der Apnoephase zu einer Aktivierung des Barorezeptorreflexes (Leuenberger et al., 2001, Tamisier et al., 2004).

Die Stimulation sensorischer Afferenzen durch Bestreichen der Haut und Schreckreize durften keine Signale evozieren. Die Ableitung musste eine ruhige Grundlinie („Baseline“) und ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis aufweisen. Um die Bursts als solche zu identifizieren, sollte die Amplitude des Bursts mindestens dreimal so hoch sein wie die Amplitude der Baseline.

Sobald die Ableitung als beurteilbar galt, wurden die Probanden aufgefordert, in der Position zu verbleiben und möglichst ruhig zu liegen, um mögliche Dislokationen und damit einen Verlust des Ableitsignals zu vermeiden.

3.4.1.3 Mikroneurographie mit pharmakogener Barorezeptorreflextestung

Beim Barorezeptorreflex-Test wird der arterielle Blutdruck medikamentös durch vasoaktive Substanzen zunächst gesenkt und nachfolgend über das Ruhenniveau angehoben (Eckberg und Fritsch, 1993).

Eine Senkung des arteriellen Blutdrucks wurde durch den Vasodilatator Nitroprussidnatrium (Nipruss®, SCHWARZ PHARMA AG, Monheim) hervorgerufen. Es führt über eine NO-Freisetzung zur Reduktion des Tonus der Widerstands- und Kapazitätsgefäße.

In dieser Studie wurde das modifizierte Oxford Protokoll benutzt, bei dem ein Bolus von 100µg Nitroprussid-Natrium in fünfprozentiger Glucoselösung injiziert wird (Laude et al., 2004). Nach der intravenösen Verabreichung dieser Mischung folgte eine Ruhephase von etwa acht Minuten, die eine Auswaschung des Nitroprussidnatriums und die Normalisierung des arteriellen Blutdruckes zum Ziel hatte.

Anschließend wurden 150µg Phenylephrin in Aqua destillata gelöst und intravenös appliziert. Phenylephrin ist ein Sympathomimetikum, das die Bluthirnschranke nicht überwindet und seine Wirkung ausschließlich peripher entfaltet. Der Wirkmechanismus beruht auf einer Stimulation der α 1-Rezeptoren der Gefäßmuskelzellen und führt zu einer Vasokonstriktion (Starke, 2004).

3.4.1.4 Auswertungen der Mikroneurographie

Nach Beendigung der Studie erfolgte die Auswertung der mikroneurographischen Ableitungen offline ohne Kenntnis der durchgeführten Behandlung. Hierbei zählten wir die MSNA Bursts und quantifizierten sie mit Hilfe eines analytischen Computerprogramms (Chart 5 for Windows). Dafür teilten wir den gesamten Versuchszeitraum in Fünf-Minuten-Intervalle ein. Die jeweils letzte Minute der Fünf-Minuten-Intervalle zählten wir dann manuell aus. Angegeben wurde die Burstfrequenz (Burstanzahl pro Minute).

Der Zeitraum, in dem die Barorezeptorreflextestung stattfand, wurde gesondert berücksichtigt. Jeweils 30 Sekunden nach der Injektion und Anflutung von Nitroprussidnatrium und Phenylephrin werteten wir in einem Ein-Minuten-Intervall die Burstfrequenz aus.

Die Auswertung der Burstfrequenz während des Versuchablaufes erfolgte aufgrund der beschriebenen interindividuellen Unterschiede in der sympathischen Nervenaktivität als relative Abweichungen. Als individuelle Referenz wurde die vor Versuchsbeginn ermittelte Baseline gewertet.

Die Ableitungen der zwei Versuchstage der Probanden wurden durch mich ausgewertet und durch meinen Betreuer kontrolliert. Die Übereinstimmung dieser beiden Analysen betrug über 95%.

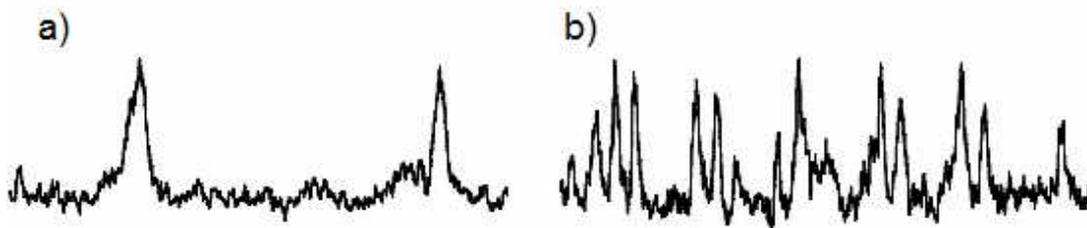


Abbildung 6. Exemplarische Darstellung einer mikroneurographischen Ableitung der muskulären sympathischen Nervenaktivität in Bursts. Links abgebildet ist die Grundfrequenz (a), rechts die Aktivierung z.B. während der medikamentösen Barorezeptorreflextestung (b), Abbildung modifiziert nach Wilson et al., 2004.

3.4.2 Mikrodialyse

3.4.2.1 Ablauf und Durchführung der Mikrodialyse

In den durchgeführten Versuchen platzierten wir an jedem Versuchstag jeweils zwei Mikrodialysekatheter (CMA, Microdialysis Catheter, Solna, Schweden). Zum einen in das periumbilikale Fettgewebe und zum anderen in das Muskelgewebe des Unterarms. Nach Desinfektion der Hautstellen legten wir mit Hilfe einer Kanüle einen Stichkanal an und platzierten schließlich den Mikrodialysekatheter mittels Führungsnadel im Gewebe. Anschließend spülten wir den Katheter mit einer physiologischen Lösung bekannter Zusammensetzung (Ringer-Lösung) und schlossen diesen an die spezielle Präzisionspumpe (CMA perfusion pump, Solna, Schweden). Mit einer Flussgeschwindigkeit von $1\mu\text{l}/\text{min}$ wurde dann das Gewebe mit der Flüssigkeit perfundiert. Nach einer Vorlaufzeit von 15 Minuten tauschten wir ab Versuchsbeginn, in viertelstündlichen Abständen die Mikrovials aus, so dass sie jeweils eine Füllmenge von $15\mu\text{g}$ Dialysat enthielten. Anschließend wurden die Mikrovials luftdicht verschlossen und bei -30°C eingefroren. In den durchgeführten Versuchen verwendeten wir Katheter mit einer Membranlänge von 30mm und einem Cut-off von 20kDalton.

Die verwendeten Mikrodialysekatheter weisen bei einem Perfusionsfluss von $0,3\mu\text{l}/\text{min}$ eine Recovery, also Wiederfindungsrate, von nahezu 100% auf. Für die Analyse des Mikrodialysats sind mindestens $9\mu\text{l}$ Dialysatvolumen notwendig. Das bedeutet, dass eine Auswertung des Dialysates nur etwa alle 30 Minuten vorgenommen werden kann. Da es in unserer Studie von großer Bedeutung war, kurzfristige Veränderungen der Metabolite im subkutanen Fettgewebe und in der Muskulatur festzuhalten, haben wir die Flussrate erhöht, um so alle 15 Minuten eine Analyse vornehmen zu können. Wir nahmen dabei in Kauf, dass dadurch auch die Recovery abnimmt und somit die Konzentration im Dialysat nicht mehr zu 100% der Konzentration im Interstitium entspricht. Deshalb stellten wir die Konzentrationsveränderungen als relative Abweichungen von den zuvor ermittelten Basalwerten der Vorlaufzeit dar.

Wir verwendeten in unserer Studie das Stoffwechselprodukt Glycerol als Marker für die Lipolyse. Aus vorangegangenen Untersuchungen ist die Recovery von Glycerol unter einem ähnlichen experimentellen Setting bekannt. Sie beträgt im Muskelgewebe 90% und im Fettgewebe annähernd 100% (Hagstrom-Toft et al., 1998).

3.4.3 Laser Doppler Flowmetrie zur Bestimmung des subkutanen und kutanen Blutflusses

In den durchgeführten Versuchen stellten wir die Mikroperfusion des subkutanen Fettgewebes der Bauchwand sowie der Haut dar. Die LDF-Sonde, die der Durchblutungsmessung im subkutanen Fettgewebe diente (Probe 402 needle probe, Perimed, Järfälla, Schweden), brachten wir mit Hilfe einer Venenverweilkanüle (Venflon™ 0.8/25mm) in einem 45° Winkel etwa drei Zentimeter lateral und zwei Zentimeter kaudal des Bauchnabels ein. Die Sonde zur Bestimmung der Hautdurchblutung (Probe 407-1, small straight probe, Perimed, Järfälla, Schweden) klebten wir, in einem Abstand von zwei Zentimetern zu der subkutanen Sonde, auf die Haut.

3.4.4 Pneumobelt®, Finapres®- und EKG-Aufzeichnungen

Während der gesamten Versuchszeit zeichneten wir kontinuierlich die Atemexkursionen mittels Pneumobelt®, den Blutdruck mit Hilfe einer Finapres®-Manschette und die Herzfrequenz auf.

Die Ableitung des EKG erfolgte über drei selbstklebende, thorakal in Herzachse angebrachte Einmalelektroden. Mit Hilfe eines elastischen Gurtes (angebracht in Höhe der unteren Thoraxapertur) und einem Druckwandler (Pneumobelt®, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) registrierten wir kontinuierlich die Atemexkursionen der Probanden. Der Druckwandler ermöglicht atmungsbedingte Anspannungen und Entspannungen des Gurtes in elektrische Signale umzuwandeln.

Die kontinuierliche, nicht invasive Erfassung des arteriellen Blutdrucks erfolgte photoplethysmographisch über eine am Mittelglied des rechten Mittelfingers angebrachte

pneumatische Manschette (Finapres®, Ohmeda 2300, BOC Health Care, Colorado, USA). Erwähnenswert ist, dass die kontinuierliche Messung des arteriellen Blutdrucks mit der Finapres®-Methode nicht invasiv sehr präzise Blutdruckwerte für jeden einzelnen Herzschlag ermittelt. Jedoch kann es bei Lageveränderungen der ableitenden Hand zu erheblichen Schwankungen in der absoluten Höhe der gemessenen Blutdruckwerte kommen. Bei der Baroreflextestung erfolgte bei stabiler Position der Hand (in Herzhöhe) ein verlässliches Monitoring.

Ergänzend bestimmten wir vor jedem Versuchstag den Blutdruck der Probanden manuell und eichten danach den Finapres®-Computer.

3.4.5 Datenaufzeichnung - Powerlab®

Die gewonnenen Daten aus Mikroneurographie, EKG, Pneumobelt®, Finapres®, und Laser Doppler Flowmetrie zeichneten wir mit Hilfe eines PC-gestützten Multifunktionsgerätes, welches eine simultane, analog-digitale Umwandlung und Speicherung biologischer Parameter ermöglicht (PowerLab®, ADInstruments, Heidelberg), auf. Hierbei wählten wir eine Samplingrate von 100/s. Zur Analyse der Aufzeichnung wurde die Chart 5-Software (ADInstruments, Spechbach, Deutschland) verwendet. Die zugehörige Software (Chart for Windows 5.0, ADInstruments, Heidelberg) ermöglicht eine Visualisierung und Auswertung der Daten.

3.4.6 Analytik der Proben

3.4.6.1 Mikrodialysate

Die Bestimmungen von Glycerol, Glucose, Laktat und Pyruvat aus tief gefrorenem Mikrodialysat erfolgte durch einen speziellen CMA 600 Microdialysis Analyzer (CMA 600/Microdialysis AB, Stockholm, Schweden). Die Analyse basiert auf einer photometrischen 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.

3.4.6.2 Blutanalysen

Während eines Versuchstages entnahmen wir insgesamt sechs Blutproben aus einer Venenverweilkanüle mit einem Lumen von 18G. Die gesamte Blutmenge lag bei 120ml. Um eine eventuelle Verdünnung der Blutproben zu vermeiden, verwarfen wir jeweils die ersten fünf Milliliter der Proben.

Die Blutproben für die Messungen von Insulin, Cortisol, Leptin, freien Fettsäuren, BNP und Adiponektin nahmen wir in Serumröhrchen (S-Monovette® 9ml Z, Sarstedt, Nymbrecht) ab.

Die Blutentnahme zur Bestimmung der Katecholamine und ACTH erfolgte in EDTA-Röhrchen (S-Monovette®, 2,7ml K3E, Sarstedt, Nymbrecht). Für die Auswertung von Glucose, Glycerol und Laktat standen Fluorid-Röhrchen (S-Monovette®, 2,6ml Sarstedt, Nymbrecht) zur Verfügung.

Alle Proben zentrifugierten wir unmittelbar nach der Entnahme für einen Zeitraum von zehn Minuten bei 4000 Umdrehungen/min (Labofuge 400R, Heraeus Instruments, Hanau), pipettierten sie in Eppendorf Gefäße und lagerten sie anschließend bei Temperaturen von -30°C, bzw. die Katecholamine bei -80°C. Die laborchemische Auswertung erfolgte innerhalb von etwa vier bis sechs Wochen nach Durchführung des Versuches.

Die Analyse der Proben wurde im Routinelabor des Institutes für Klinische Chemie der medizinischen Universität zu Lübeck durchgeführt.

Die freien Fettsäuren wurden enzymatisch mit Acyl-CoA Synthase, Acyl-CoA Oxidase und Peroxidase bestimmt (Roche Cat. No. 11 383 175, free fatty acids, halfmicrotest).

Die Bestimmung von ACTH erfolgte durch einen kommerziell erhältlichen, sequenziellen immunometrischen Chemielumineszens-Assay (IMMULITE® ACTH, GPC, Los Angeles, USA). Die analytische Sensitivität liegt bei 9 pg/ml (2 pmol/l).

Die Bestimmung von Cortisol erfolgte durch einen kompetitiven Chemielumineszenz-Immunassays (IMMULITE® Cortisol, GPC, Los Angeles, USA).

Die Plasma- bzw. Serumkonzentrationen der nachfolgenden Parameter wurden teilweise nach Vorbehandlung, mit unterschiedlichen Assays quantifiziert. Zur Vereinfachung sind die verwendeten Assays in der folgenden Tabelle angegeben.

Tabelle 2. Analysemethoden von Insulin, Leptin, Adiponektin, Noradrenalin, Adrenalin und Glukose.

Parameter	Name/Hersteller
Insulin	IMMULITE/IMMULITE 1000 Insulin DPC®, Los Angeles, USA
Leptin	HUMAN LEPTIN RIA KIT, LINCO RESEARCH, Missouri, USA
Adiponektin	RD 195023100 Human Adiponectin ELISA, Bio Vendor GmbH, Heidelberg, Deutschland
Noradrenalin	HPLC-System, Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Chromsystems®, München)
Adrenalin	HPLC-System, Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Chromsystems®, München)
Glukose	Beckman Glucose- Analysator 2®

3.5 Statistik

Bei den Proben handelte es sich um verbundene Stichproben mit Darstellung der Parameter eines jeden Probanden vor Behandlung mit entweder MSH/ACTH(4-10) oder Placebo, und im zeitlichen Verlauf danach. Die statistische Auswertung erfolgte in zwei Schritten, zunächst mit Hilfe einer zweifaktoriellen ANOVA (analysis of variance) mit dem Faktor „Behandlung (Placebo/Verum)“ und dem Messwiederholungsfaktor „Zeit“ über sämtliche Messwerte. Stellten sich in diesem globalen Test signifikante Unterschiede dar, wurde eine post-hoc Bonferroni Analyse der Einzelwerte bezüglich des Behandlungseffektes (Placebo versus MSH/ACTH(4-10)) angeschlossen. Ein p-Wert von 0.05 wurde als Signifikanzniveau festgelegt. Alle Daten werden als Mittelwerte \pm SD (Standardabweichung) angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Gesamtkollektivs

Das durchschnittliche Alter der 10 Probanden betrug 27,4 Jahre, der älteste Teilnehmer war 37 Jahre und der Jüngste 21 Jahre alt. Die anthropometrischen Daten gehen aus Tabelle 3 hervor.

Tabelle 3. Anthropometrische Daten des Probandenkollektivs, MW \pm SD.

Alter in Jahren	27,4 \pm 5,7
Größe (cm)	185 \pm 7,2
Gewicht (kg)	77 \pm 5,5
BMI in (kg/m ²)	22,3 \pm 1,4
Taillenumfang (cm)	77,7 \pm 5,3
Hüftumfang (cm)	94,7 \pm 4,8

4.2 Mikroneurographie

4.2.1 Sympathische Nervenaktivität

Da sich die Ableitung der MSNA aufgrund von Dislokationen der Elektrode mitunter schwierig gestaltete und nur Ableitungen bei korrekt liegender Elektrode während der Aufzeichnung auszuwerten sind, konnten zur weiteren Analyse der MSNA lediglich acht Ableitungen in der MSH/ACTH(4-10)-Gruppe und neun Ableitungen in der Placebo-Gruppe verwendet werden.

In den auswertbaren Ableitungen stellten sich keine signifikanten Unterschiede in der basalen muskulär-sympathischen Nervenaktivität im Vergleich zwischen der Placebo- und der Verumgruppe dar.

4.2.2 Sympathische Nervenaktivität während der medikamentösen Barorezeptorreflextestung

Während der medikamentösen Barorezeptorreflextestung mit Nitroprussid-Natrium und Phenylephrin zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Verum- und der Placebogruppe. Die medikamentöse Blutdrucksenkung mit Nitroprussidnatrium erhöhte die mittlere Burstfrequenz beider Probandengruppen:

In der MSH/ACTH(4-10)-Gruppe stieg die Burstfrequenz allerdings signifikant höher an als in der Placebogruppe. In Relation zum Ausgangswert stieg die Burstfrequenz jeweils signifikant in der Placebogruppe auf $25,2 \pm 12,0$ vs. $7,3 \pm 4,16$ und in der Verumgruppe auf $40,1 \pm 15,6$ vs. $10,8 \pm 8,0$ Bursts/min, $p < 0,05$ (Abbildung 7). Nach Applikation von Phenylephrin zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der MSH/ACTH(4-10)- und der Placebogruppe. Nach MSH/ACTH(4-10) Gabe sank die Burstfrequenz, im Vergleich zu dem erhobenen Ausgangswert, auf $8,9 \pm 12,3$ vs. $10,8 \pm 8$ Bursts/min(Ausgangswert) und nach Placebogabe stieg die Burstfrequenz auf $10,0 \pm 10$ vs. $7,3 \pm 4,16$ Bursts/min (Ausgangswert).

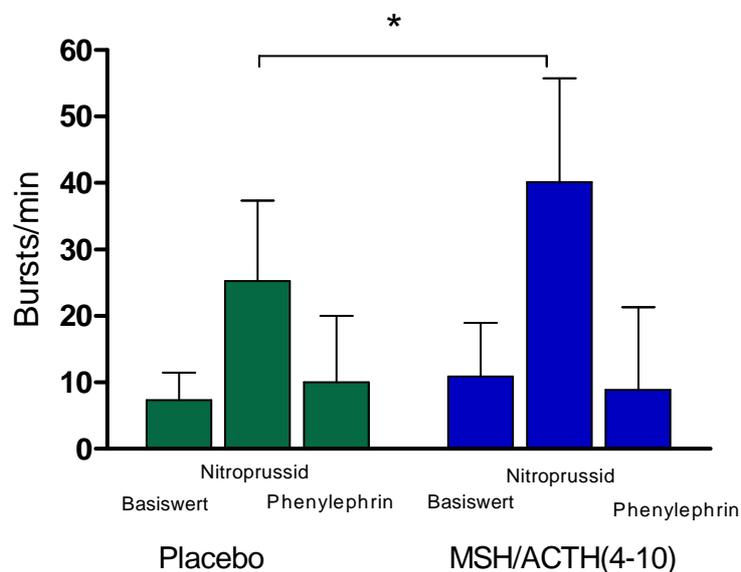


Abbildung 7. Burstfrequenz während des Ausgangswertes sowie nach medikamentöser Barorezeptorreflextestung mit Nitroprussid und Phenylephrin in der Placebo- und Verumgruppe. Darstellung von Mittelwerten \pm SD; $n=8$ in der MSH/ACTH(4-10)- und $n=9$ in der Placebogruppe. $*=p < 0,05$.

4.3 Vitalparameter

Weder der arterielle Blutdruck noch die Herzfrequenz wurden durch die intranasale Gabe von MSH/ACTH(4-10) beeinflusst.

4.4 Mikrodialyse

Die absoluten Werte der Mikrodialysedaten spiegeln aufgrund der reduzierten Recovery bei gesteigerter Flussrate der Mikrodialyseperfusion nicht die reale Gewebekonzentration der Parameter wider. Die Ergebnisse werden deshalb als relative Abweichung des erhobenen Ausgangswertes vor Gabe von Placebo bzw. MSH/ACTH(4-10) dargestellt. Die absoluten Basalwerte sind im Folgenden gesondert gekennzeichnet. Die Gesamtheit der absoluten Werte findet sich in den Tabellen 4 und 5 im Anhang.

4.4.1 Interstitielles Glycerol

Im Vergleich zu Placebo bewirkte MSH/ACTH(4-10) eine signifikante Erhöhung der interstitiellen Glycerolkonzentration im weißen abdominellen Fettgewebe (Abbildung 8a).

Der Unterschied zu der Placebogruppe stellte sich 45 Minuten nach intranasaler Applikation dar. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich eine Abweichung vom Ausgangswert 100% (MSH/ACTH(4-10)-Gruppe $74 \pm 76,8 \text{ mmol/l}$, Placebogruppe $103 \pm 48,1 \text{ mmol/l}$) in der Placebogruppe von $120,1 \pm 37,0\%$ und der Verumgruppe von $156,0 \pm 55,8\%$ verzeichnen ($p < 0,05$). Während des weiteren Versuchablaufes blieben die erhöhten interstitiellen Glycerolspiegel nach intranasaler Applikation von MSH/ACTH(4-10) bestehen. Im Vergleich zu der Placebogruppe blieb der Glycerolspiegel auch nach 135 Minuten in der Verumgruppe signifikant erhöht ($185,3 \pm 72,2\%$ versus $142 \pm 60,6\%$; $p < 0,05$).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des weißen Fettgewebes zeigte sich im Skelettmuskel des Unterarms lediglich ein kurz andauernder Anstieg des Glycerolspiegels mit einem Maximum 60 Minuten nach intranasaler Applikation. Die Abweichungen im Vergleich zum Ausgangswert 100% (MSH/ACTH(4-10)-Gruppe $48,8 \pm 19,27 \text{ mmol/l}$, Placebogruppe

60,63±16,48mmol/l) betragen zu diesem Zeitpunkt 109,5±47,0% in der MSH/ACTH(4-10)-Gruppe und 94,6±17,0% in der Placebo-Gruppe. Diese Werte waren nicht signifikant unterschiedlich ($p=0.12$; Abbildung 8b).

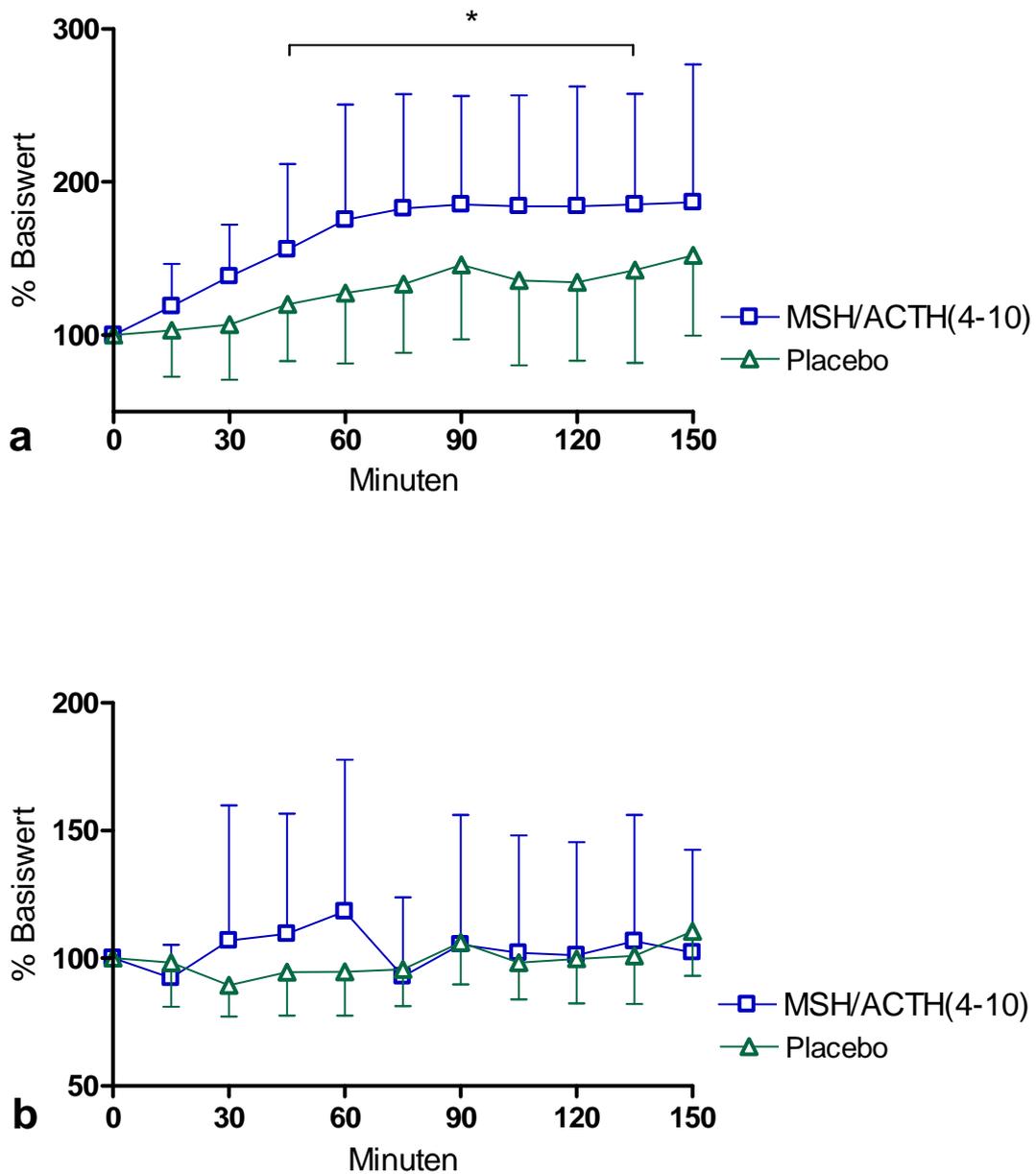
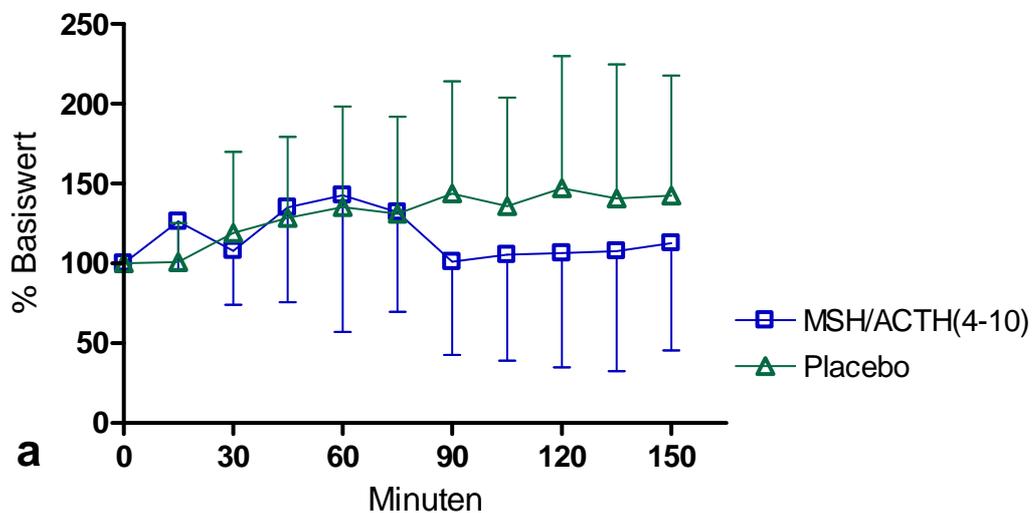


Abbildung 8. Interstitielle Glycerolkonzentrationen im subkutanen abdominellen Fettgewebe (a) und im Muskelgewebe (b) Darstellung von Mittelwerten \pm SD; $n=10$ pro Gruppe. $*=p<0.05$.

4.4.2 Interstitielles Pyruvat und Laktat

Im Interstitium des abdominellen weißen Fettgewebes stellten sich keine signifikanten Unterschiede in der Pyruvatkonzentration zwischen der Verum- und der Placebogruppe dar (Abbildung 9a). Im Muskelgewebe kam es bis zum Ende des Versuches zu einem über den zeitlichen Verlauf signifikanten Anstieg des Pyruvatspiegels in der MSH/ACTH(4-10)-Gruppe (nach 135 Minuten $409,5 \pm 151,05\%$ vs. $318 \pm 178,45\%$ und nach 150 Minuten $445,4 \pm 179,25\%$ vs. $324,48 \pm 166,71\%$), im Vergleich zum Ausgangswert 100% (MSH/ACTH(4-10)-Gruppe $23,5 \pm 21,01 \text{ mmol/l}$, Placebogruppe $25 \pm 20,3 \text{ mmol/l}$), ohne in der post-hoc Analyse eine Signifikanz zwischen den beiden Gruppen zu erreichen. (Abbildung 9b).



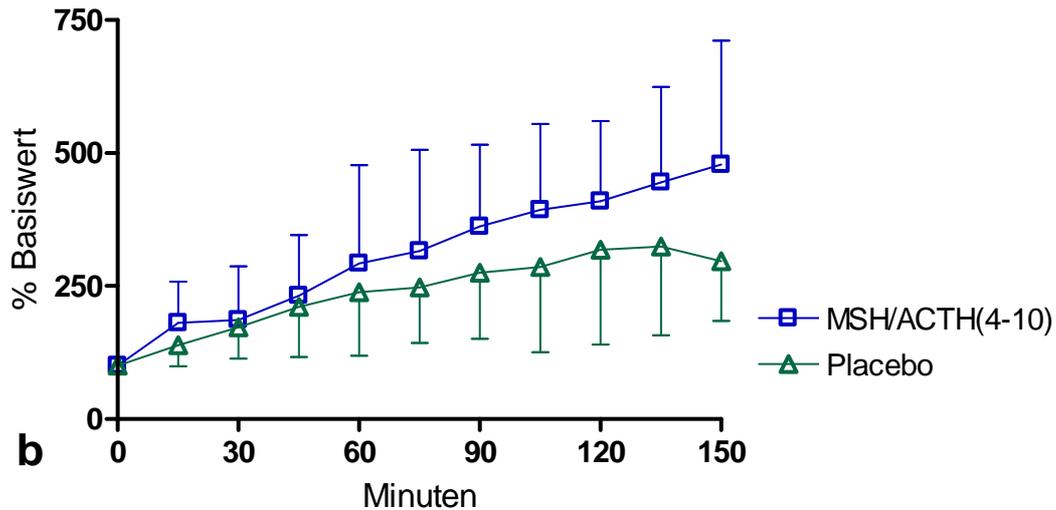
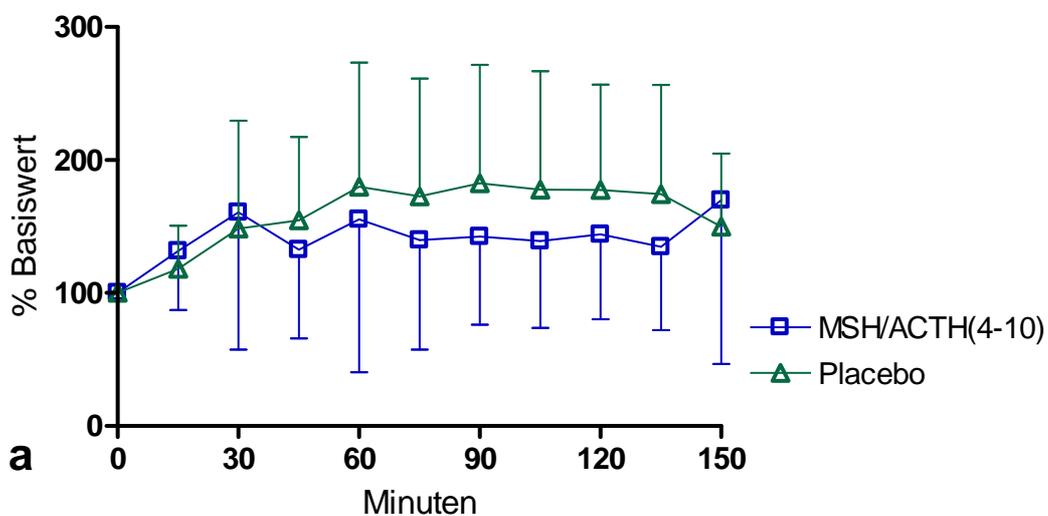


Abbildung 9. Interstitielle Pyruvatkonzentrationen im subkutanen abdominellen weißen Fettgewebe (a) sowie im Muskelgewebe (b). Darstellung von Mittelwerten \pm SD; $n=10$ pro Gruppe.

Nach der Gabe von MSH/ACTH(4-10) stellten wir keine signifikanten Veränderungen in der interstitiellen Laktatkonzentration im Muskel- oder subkutanen Fettgewebe fest. So kam es nach Applikation von MSH/ACTH(4-10) im weißen Fettgewebe zu einem initialen Anstieg nach 30 Minuten auf $160,63 \pm 103,18\%$ vs $148,27 \pm 81,23\%$ in der Placebogruppe (Ausgangswert = 100%: MSH/ACTH(4-10) $0,61 \pm 0,36 \text{ mmol/l}$ vs Placebo $0,75 \pm 0,47 \text{ mmol/l}$) (Abbildung 10 a und b).



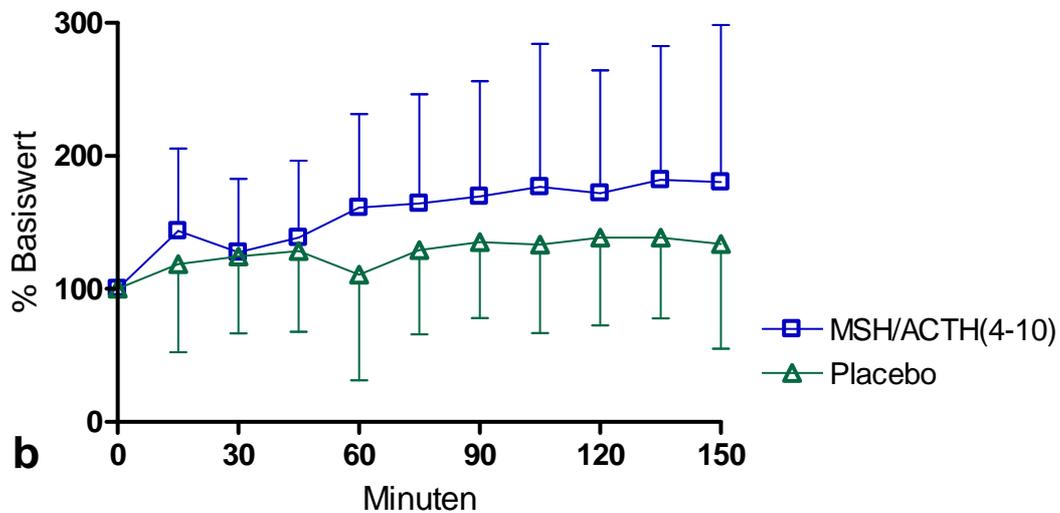


Abbildung 10. Interstitielle Laktatkonzentrationen im subkutanen abdominellen weißen Fettgewebe (a) sowie im Muskelgewebe (b) Darstellung von Mittelwerten \pm SD; $n=10$ pro Gruppe.

4.4.3 Interstitielle Glucose

Die interstitiellen Glukosekonzentrationen unterschieden sich unter Ruhebedingungen in der Placebo- und Verumgruppe nicht voneinander. Im Interstitium des weißen Fettgewebes stellten sich keine Veränderungen dar (Abbildung 11a). Die MSH/ACTH(4-10) Gabe führte zu einem insignifikanten Anstieg des interstitiellen Glucoselevels vom Basalwert 100% (MSH/ACTH(4-10)-Gruppe $2,74 \pm 1,23 \text{ mmol/l}$ / Placebo $2,38 \pm 0,93 \text{ mmol/l}$) im peripheren Muskelgewebe nach 30 Minuten ($131,24 \pm 44,95\%$ vs. $101,33 \pm 27,1\%$) und erreichte nach 60 Minuten ein Plateau ($145,05 \pm 51,43\%$ vs. $100,45 \pm 34,48\%$) (Abbildung 11b).

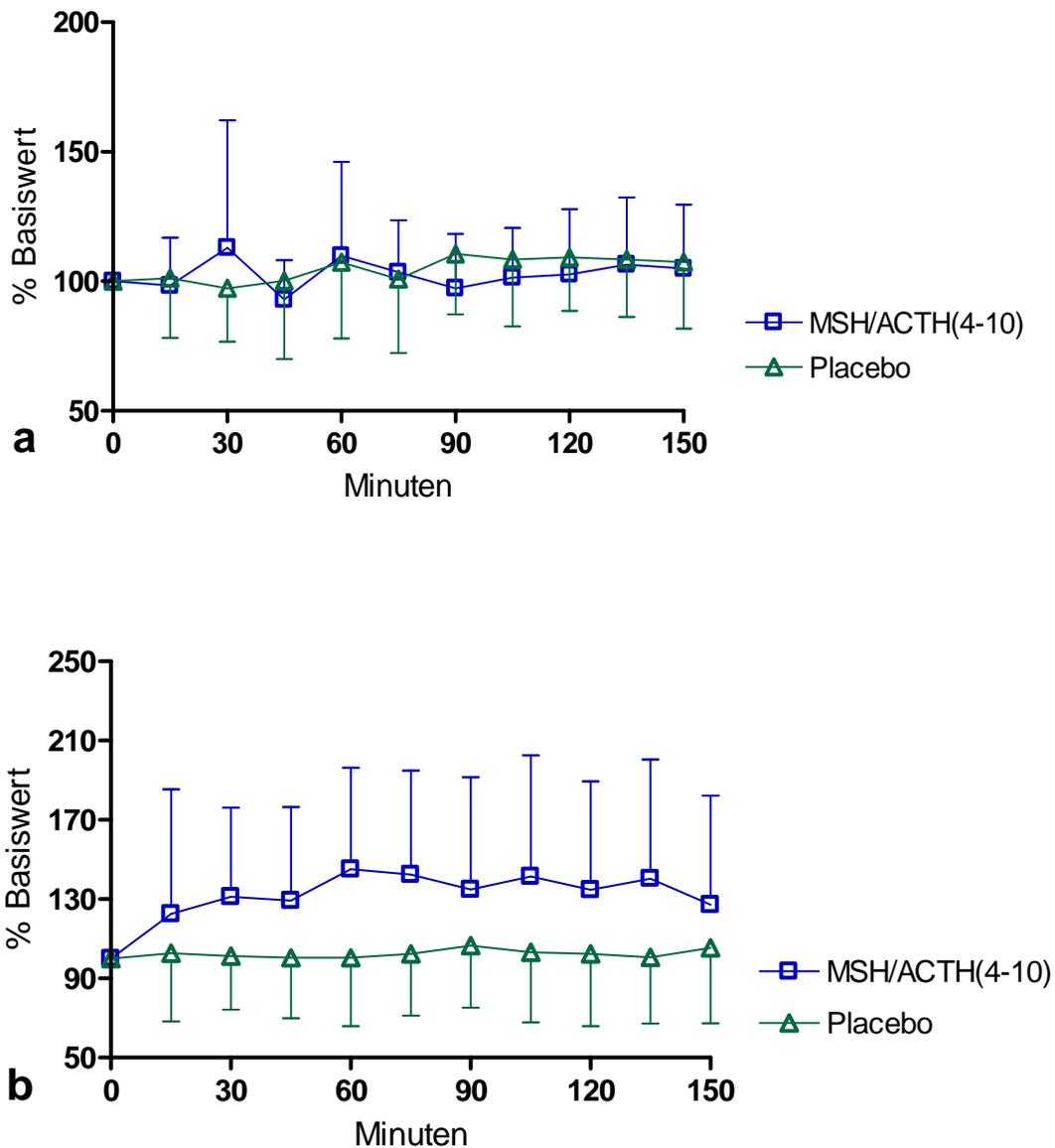


Abbildung 11. Interstitielle Glucosekonzentrationen im subkutanen abdominellen weißen Fettgewebe (a) sowie im Muskelgewebe (b). Darstellung von Mittelwerten \pm SD; $n=10$ pro Gruppe.

4.5 Serum- und Plasmakonzentrationen

4.5.1 Glycerol, freie Fettsäuren, Glucose und Laktat

In dieser Gruppe kam es zu keiner signifikanten Änderungen der Parameter im Serum, insbesondere kam es nach intranasaler Gabe von MSH/ACTH(4-10) zu keinem Anstieg des Glycerolspiegels oder der freien Fettsäuren.

4.5.2 BNP, Insulin, Leptin, Adiponektin, ACTH und Cortisol

Während des Versuchablaufes ergab sich, verglichen mit der Placebogruppe, keine signifikante Änderung der Plasma- und Serumkonzentrationen für BNP, Insulin, Leptin, Adiponektin, ACTH oder Cortisol nach intranasaler Verabreichung von MSH/ACTH(4-10). Darstellung der Cortisolkonzentration in Abbildung 12; Darstellung der ACTH-Konzentration in Abbildung 13.

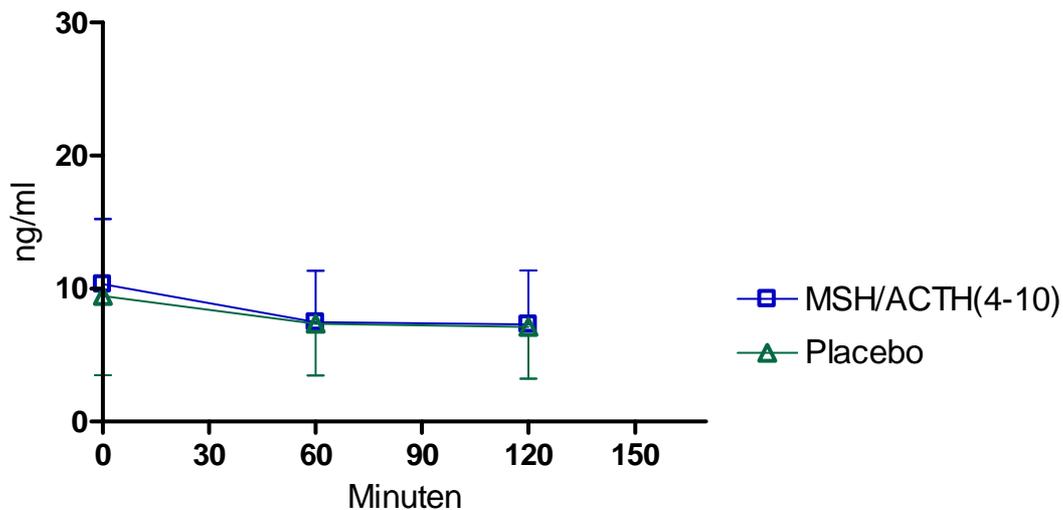


Abbildung 12. Cortisolkonzentration im Serum (in ng/ml). Darstellung von Mittelwerten \pm SD; $n=10$ pro Gruppe.

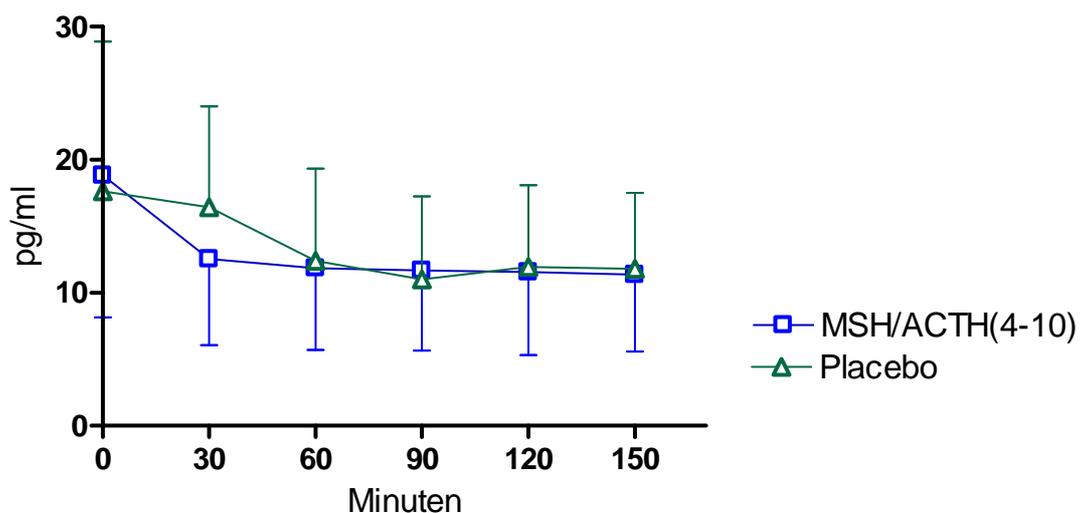


Abbildung 13. ACTH-Konzentration im Serum (in pg/ml). Darstellung von Mittelwerten \pm SD; $n=10$ pro Gruppe.

4.5.3 Katecholamine

Die Plasmakonzentration von Adrenalin zeigte diskrete, nicht signifikante Unterschiede zwischen der MSH/ACTH(4-10)- und der Placebogruppe. Die zu Beginn gemessene Konzentration von Adrenalin betrug $22,3 \pm 5,59$ pmol/l, 60 und 120 Minuten nach intranasaler Gabe von MSH/ACTH(4-10) kam es zu einem diskreten Abfall der Konzentration auf $18,5 \pm 4,06$ bzw. $20,4 \pm 5,66$ pmol/l und nach Placeboapplikation zu einem leichten Anstieg auf $25,6 \pm 11,41$ bzw. $28,1 \pm 16,35$ pmol/l. Diese Unterschiede erreichten keine Signifikanz. Eine Beeinflussung von Dopamin und Noradrenalin durch die Verabreichung von MSH/ACTH(4-10) zeigte sich nicht (Abbildung 14).

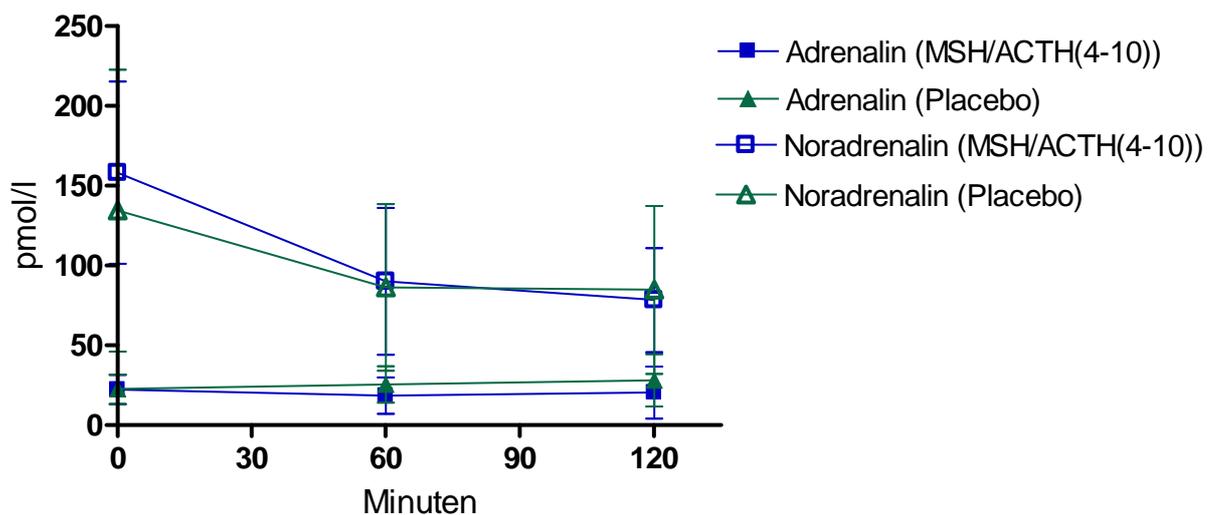


Abbildung 14. Adrenalin- und NoradrenalinKonzentrationen in pmol/l. Darstellung von Mittelwerten \pm SD; $n=10$ pro Gruppe.

4.6 Gewebsperfusion

Die Perfusion des weißen Fettgewebes und der Haut wurde in unseren Versuchen durch die Laser Doppler Flowmetrie gemessen. Im Vergleich zum Ausgangswert 100% (entspricht in der MSH/ACTH(4-10)-Gruppe $43,36 \pm 79,94$ Perfusion Units und in der Placebogruppe $0,36 \pm 0,49$ Perfusion Units) zeigte sich 90 Minuten nach Applikation von MSH/ACTH(4-10) eine leicht reduzierte Perfusion der Haut $93,75 \pm 15,98\%$ im Vergleich

zur Placebogruppe, bei der es zu einem leichten Perfusionsanstieg auf $109 \pm 14,16\%$ kam. Im weißen Fettgewebe kam es in der MSH/ACTH(4-10) Gruppe zu einer über den zeitlichen Verlauf signifikant erniedrigten Perfusion. In der post-hoc Analyse war die Perfusion im Vergleich zur Placebogruppe allerdings nicht signifikant erniedrigt. Im Vergleich zum Ausgangswert 100% (entspricht in der MSH/ACTH(4-10)-Gruppe $2,78 \pm 0,95$ Perfusion Units und in der Placebogruppe $19,71 \pm 58,23$ Perfusion Units) zeigte sich 90 Minuten nach MSH/ACTH(4-10) Gabe eine Abnahme auf $73,6 \pm 26,17\%$ und nach Placebogabe ein Anstieg auf $115,8 \pm 45,66\%$.

Darstellung der Hautperfusion in Abbildung 15 und der Perfusion des weißen Fettgewebes in Abbildung 16. Angabe in der prozentualen Abweichung der Baseline.

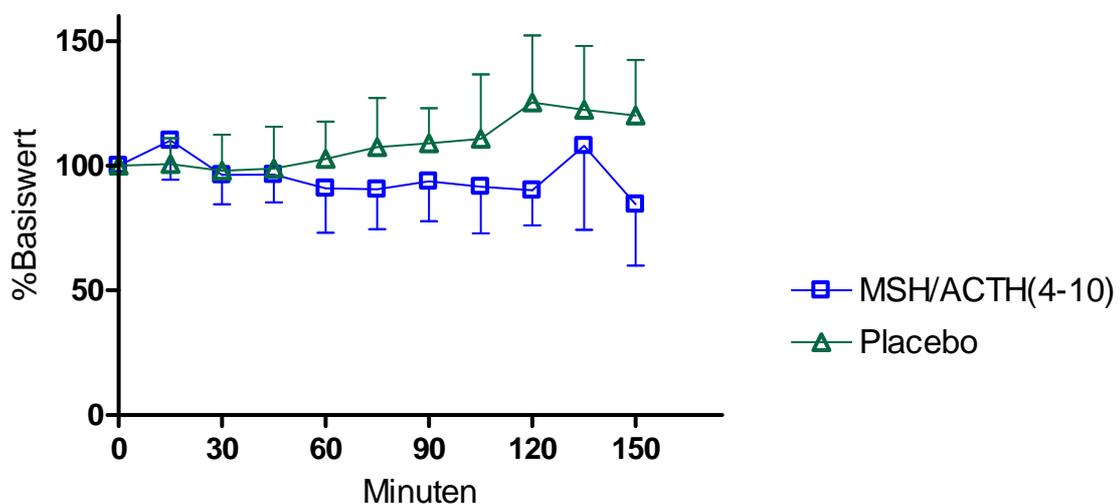


Abbildung 15. Perfusion der Haut (prozentuale Abweichung vom Basiswert). Darstellung von Mittelwerten \pm SD; $n=10$ pro Gruppe.

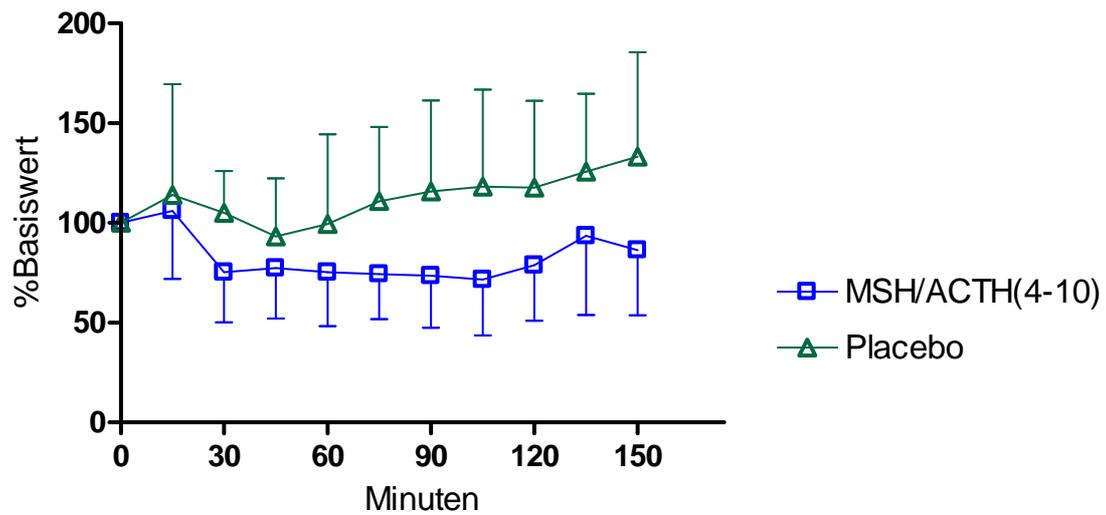


Abbildung 16. Perfusion des weißen Fettgewebes (prozentuale Abweichung von der Baseline). Darstellung von Mittelwerten \pm SD; $n=9$ in der Placebogruppe, $n=10$ in der MSH/ACTH(4-10)-Gruppe.

5 Diskussion

Die Regulation des Körpergewichtes stellt ein komplexes, bisher lediglich in den Anfängen verstandenes System dar, in dem viele verschiedene Parameter zusammenspielen. Letztlich resultiert das Körpergewicht aus dem Verhältnis von Nahrungsaufnahme zu Energieverbrauch. Sowohl die Nahrungsaufnahme als auch die Energieabgabe unterliegen unterschiedlichen regulativen Einflüssen, die eine hohe Redundanz aufweisen. Melanocortine wurden in diesem komplexen System als wichtige Komponenten des gewichtsregulierenden Systems identifiziert.

Bisher ging man davon aus, dass der gewichtsreduzierende Effekt der Melanocortine vor allem auf einer Minderung der Nahrungsaufnahme und Veränderung des Essverhaltens beruht. In Tierversuchen zeigt sich beispielsweise nach Applikation von α -MSH eine Veränderung des Fressverhaltens der Tiere mit signifikant verkürzten Mahlzeiten (Vergoni et al., 2000). Die gesteigerte Expression von Agouti related peptide (AgrP), z.B. bei leptinrezeptordefizienten Mäusen, korreliert mit einer Gewichtszunahme und führt zu einer Hypertrophie des weißen Fettgewebes. Bei genetisch veränderten Mäusen mit Überexpression von AgrP zeigt sich eine gesteigerte Nahrungsaufnahme (Graham et al., 1997, Ollmann et al., 1997, Shimada et al., 1998).

Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass zusätzlich zu der Appetitregulation andere Mechanismen eine Rolle für die gewichtsregulierende Wirkung der Melanocortine spielen. So führt die subkutane Gabe eines MC4-Rezeptor-Agonisten bei Mäusen zu einer differenziellen Reduktion von bestimmten Fettgewebekompartimenten (subkutanes und viszerales Fett). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein Gewichtsverlust zumindest teilweise unabhängig von der Nahrungsaufnahme sein muss (Strader et al., 2007). Unabhängig von der Nahrungsaufnahme kommt es nach pharmakologischer Blockade des MC4R sowie bei Rezeptordefizienz bei Nagetieren zu einer gesteigerten Triglyceridsynthese und zu einer Zunahme des weißen Fettgewebes, während die gesteigerte Aktivität des MC4R zu einer Triggerung der Lipidmobilisation führt (Nogueiras et al., 2007).

Auch in Probandenstudien zeigt sich nach sechswöchiger intranasaler Applikation der Melanocortinkernsequenz MSH/ACTH(4-10), unabhängig von Nahrungsgewohnheiten, eine signifikante Reduktion des Körpergewichtes und des Körperfettes (Hallschmid et al., 2004a). Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, über die diese Effekte vermittelt werden. Dabei könnte entweder die Hemmung eines anabolen Peptids, z.B. Neuropeptid Y, eine Rolle spielen und dadurch eine Reduktion der Nahrungsaufnahme bewirken oder MSH/ACTH(4-10) führt zu einer direkten Steigerung des Energieverbrauches.

Basierend auf dem Wissen, dass das melanocortinerge System, vorwiegend über den MC4-Rezeptor vermittelt, die Gewichtsregulation und die Energiehomöostase entscheidend beeinflusst und somit katabole, gewichtsreduzierende Effekte erzielt, war es Ziel dieser Arbeit die physiologischen Mechanismen herauszuarbeiten. Im Mittelpunkt des Fettgewebeskatabolismus steht die sympathoadrenerg induzierte Lipolyse und deren zentralnervöse Regulation. Insbesondere galt es die Frage zu untersuchen, ob durch die intranasale Applikation eines MC4 Rezeptoragonisten, MSH/ACTH(4-10), ein lipolytischer Effekt im subkutanen Fettgewebe und im Muskelgewebe auftritt und ob eine Erhöhung der sympathischen Nervenaktivität zu beobachten ist.

Da für diese Wirkung ein zentralnervöser Effekt vermutet wird, wählten wir die intranasale Gabe von MSH/ACTH(4-10). Durch die intranasale Gabe lassen sich die bei anderen Applikationsformen notwendig werdenden hohen Arzneimitteldosierungen, die eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke gewährleisten könnten, umgehen. Bei der intranasalen Peptidapplikation wird eine direkte Verbindung zwischen der Nasenhöhle und dem zentralen Nervensystem genutzt, die bei Probanden auch für MSH/ACTH(4-10) gezeigt werden konnte. Dieses Peptidderivat wurde 30 Minuten nach intranasaler Gabe im Liquor gesunder Probanden nachgewiesen (Born et al., 2002a). Es ist inzwischen auch bekannt, dass intranasal appliziertes MSH/ACTH(4-10) einen geringen, reduzierenden Einfluss auf das Gewicht bei schlanken, nicht aber bei adipösen Probanden, ausübt (Hallschmid et al., 2004a, 2006).

Unsere Ergebnisse zeigen nun, dass beim normalgewichtigen Menschen die Applikation des MCR-4-Agonisten MSH/ACTH(4-10) zu einer gesteigerter Lipolyse im abdominellen weißen Fettgewebe führt. Diese gesteigerte Lipolyse kann, neben der aus Tierversuchen bekannten Reduktion der Nahrungsaufnahme eine weitere Ursache für den anorexigenen Effekt von MSH/ACTH(4-10) sein.

5.1 Einfluss von MSH/ACTH(4-10) auf die Lipolyse

Die Mikrodialyse ermöglicht eine direkte minimal invasive Überwachung des Gewebestoffwechsels. Bei der Lipolyse werden die Triglyceride in freie Fettsäuren und Glycerol aufgespalten. Ein Glycerolanstieg in der interstitiellen Flüssigkeit im subkutanen Fettgewebe und Muskelgewebe in vivo, der sich durch Mikrodialyse erfassen lässt, ist also ein Indikator für die Lipolyse, wenn ausgeschlossen ist, dass der Anstieg nicht durch einen reduzierten Abtransport des Metaboliten durch Vasokonstriktion verursacht ist. Hagstrom-Toft et al. konnten nachweisen, dass die Glycerolkonzentration im Interstitium des Fettgewebes durch adrenerge Stimulation der Lipolyse ansteigt (Hagstrom-Toft et al., 1998). Deswegen haben wir in dieser Studie das Stoffwechselprodukt Glycerol als Marker für die stattgehabte Lipolyse verwendet.

In unseren Versuchen gelang der Nachweis der lipolytischen Effekte von MSH/ACTH(4-10) 45 Minuten nach intranasaler Applikation. Es ließ sich ein signifikanter Anstieg von Glycerol im Dialysat aus dem Fettgewebe, schon 15 Minuten nach dem zu erwartenden Nachweis der Neuropeptide im Liquor, aufzeigen. Eine signifikante Lipolyse im Muskelgewebe konnte nach Applikation von MSH/ACTH(4-10) nicht dargestellt werden.

Da insgesamt nur eine sehr kurze Zeitspanne zwischen der intranasalen Gabe des MCR4-Agonisten und dem Anstieg des interstitiellen Glycerolspiegels im peripheren Fettgewebe bestand, vermuten wir, dass die Lipolyse über eine gesteigerte sympathische Nervenaktivität, vermittelt über den zentral exprimierten MC4-R im Hypothalamus, induziert wurde. Einen Hinweis dafür, dass die Lipolyse im weißen Fettgewebe tatsächlich direkt durch sympathoneuronale Einflüsse beeinflusst werden kann, konnte in

vorangehenden Untersuchungen erbracht werden. Hier führte eine elektrische Stimulation von sensiblen Nervenfasern, die das Fettgewebe und die Haut des Oberschenkels innervieren, zu einer lokal gesteigerten Lipolyse (Dodt et al., 1999).

Es ist nicht anzunehmen, dass die Lipolyse durch Cortisol, ACTH, BNP, Adiponektin, Glucose oder Insulin induziert wurde. Die Serum- und Plasmauntersuchungen dieser Hormone zeigten in unseren Untersuchungen keine signifikanten Veränderungen. Damit übereinstimmend konnten in einer weiteren Studie weder nach der intracerebroventrikulären Gabe eines MCR-4-Agonisten, noch nach der Verabreichung eines MCR-4-Antagonisten signifikante Änderungen der Plasmalevel für Glucose, Insulin oder freie Fettsäuren dargestellt werden (Nogueiras et al., 2007).

Es gibt Hinweise, dass MSH/ACTH(4-10) einen direkten Einfluss auf die Adipozyten und die Lipolyse besitzt und diese nicht nur durch MC4-R induzierte Sympathoexzitation bedingt ist. In experimentellen Studien an isolierten Adipozyten von Mäusen gelang der Nachweis eines 7-fachen Anstiegs der freien Fettsäuren nach Vorbehandlung mit Melanotan II und α -MSH (Inkubationszeit 2h), als Zeichen stattgehabter Lipolyse (Bradley et al., 2005). Vorausgehende Studien haben verschiedene MCR Subtypen auf den Adipozyten von Nagetieren nachgewiesen. Dabei fanden sich MC2-R und MC5-R auf Fettgewebszellen, nicht aber MC1-R, MC3-R, MC4-R. Angenommen wird, dass die melanocortininduzierte Lipolyse so vor allem über den MC5-R vermittelt wird, da der MC2-R lediglich ACTH bindet (Boston und Cone, 1996). Agouti-Protein als Melanocortinrezeptorantagonist konnte dementsprechend eine Hemmung der Lipolyse bewirken (Moussa und Claycombe, 1999, Xue et al., 1998).

Gegen einen reinen peripher vermittelten Effekt könnte sprechen, dass im Fettgewebe des Menschen lediglich der MC1-R in relevantem Ausmaß exprimiert wird, und dass die Bindung an diesen Rezeptor die Lipolyse nicht induziert (Hoch et al., 2007, Hoch et al., 2008).

5.2 Einfluss von MSH/ACTH(4-10) auf die lokale Durchblutung der Haut und des subkutanen Fettgewebes

Die lokale Durchblutung spielt eine Rolle in der Regulation des interstitiellen Glycerolspiegels. Eine Verminderung des Blutflusses kann zu einer Erhöhung des Glycerolspiegels im Extrazellulärraum des Fettgewebes führen (Enoksson et al., 1995). Das würde in unserem Versuch bedeuten, dass wir bei lokalen Veränderungen der Durchblutung während des Versuchablaufs falsch negative oder falsch positive Werte für die Beeinflussung der Lipolyse aufzeichnen würden.

Wir haben daher die Laser Doppler Flowmetrie zur kontinuierlichen Überwachung der Perfusion im subkutanen Fettgewebe genutzt. Nach MSH/ACTH(4-10) Applikation zeigte sich ein tendenziell niedrigerer Blutfluss über den Versuchszeitraum als in der Placebogruppe. Dieser war aber im Vergleich zur Placebogruppe nicht signifikant. Daher halten wir es für unwahrscheinlich, dass der nachgewiesene Anstieg des interstitiellen Glycerolspiegels in einer Änderung des lokalen Blutflusses im Fettgewebe begründet ist und werten ihn als Zeichen einer induzierten Lipolyse.

5.3 Einfluss von MSH/ACTH(4-10) auf die sympathische Nervenaktivität

Die Nahrungsaufnahme und der Energieumsatz werden im Gehirn gesteuert. Die dominierende Rolle nimmt hierbei der Hypothalamus ein. Im Rahmen der Energiehomöostase senden periphere Energiespeicher, wie z.B. das Fettgewebe, endokrine Signale an das zentrale Nervensystem. Neben der appetitregulierenden Wirkung der endokrinen Organe sind die katabolen, neuronal vermittelten Effekte von besonderer Bedeutung. Ein Beispiel ist Leptin, welches im peripheren Fettgewebe synthetisiert wird und im Hypothalamus an spezifische Rezeptoren bindet und somit über die verfügbare Energie im Organismus Auskunft gibt. Es reguliert als afferenter Teil eines negativen Feedbacksystems den Appetit und die Nahrungszufuhr (Ahima und Flier, 2000, Pelleymounter et al., 1995). Der efferente Anteil zu den peripheren Energiespeichern

besteht hauptsächlich aus neuronalen Signalen. Es ist aus Tierexperimenten bekannt, dass Leptin die sympathische Nervenaktivität steigert (Haynes et al., 1999).

Auch für das melanocortinerge System sind neben dem appetitregulierenden Einfluss katabole, über das sympathische Nervensystem steuernde Effekte beschrieben.

Das sympathische Nervensystem verbindet die zentralen Kontrollpunkte der Energiehomöostase im Hypothalamus mit den Adipozyten des weißen und braunen Fettgewebes. In tierexperimentellen Arbeiten gelang der Nachweis von mRNA, die für den MC4 Rezeptor kodiert, auf Nervenendigungen der zum inguinalen weißen Fettgewebe führenden sympathischen Efferenzen (Song et al., 2005). Diese Befunde unterstützen unsere Hypothese einer MC4-R vermittelten Modulation des sympathischen Nervensystems in der Regulation peripherer Lipolyse.

In verschiedenen tierexperimentellen Studien konnte eine unmittelbare Beeinflussung des sympathischen Nervensystems durch Melanocortine nachgewiesen werden.

Mäuse mit genetisch bedingter α -MSH-Überexpression haben einen signifikant höheren mittleren arteriellen Blutdruck (Rinne et al., 2008). In Analogie dazu führt die intracerebroventrikuläre Applikation eines Melanocortinrezeptoragonisten bei Tieren zu sympathoexzitatorischen Effekten wie Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes und Erhöhung der Herzfrequenz. Diese Symptome ließen sich durch eine medikamentöse Blockade der adrenergen Rezeptoren komplett unterdrücken. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die kardiovaskuläre Wirkung der Melanocortinrezeptoragonisten über eine Aktivierung des adrenergen Systems vermittelt wird (Kuo et al., 2004).

In anderen Experimenten an Ratten führt die intracerebroventrikuläre Gabe von MCR-4 Agonisten zu einem Anstieg der renalen sympathischen Nervenaktivität (RSNA) (Haynes et al., 1999, Rahmouni et al., 2003).

Die Aktivierung des SNS lässt sich im Tiermodell durch Melanocortin-Antagonisten vollständig unterdrücken. Die ausschließliche Gabe eines MC4- Rezeptorantagonisten, ohne vorhergegangene Sympathikusstimulation durch einen MC4-Rezeptoragonisten,

hatte allerdings keine Auswirkung auf die Baseline der sympathischen Nervenaktivität im weißen Fettgewebe (Nogueiras et al., 2007).

Bisher gab es in diesem Bereich größtenteils Informationen, die im Rahmen von Tierversuchen gewonnen wurden.

In einer neueren Studie wurde bei übergewichtigen Probanden mit mutiertem und funktionslosen MC4-R und einer Kontrollgruppe ohne Rezeptormutation der Einfluss zentraler Melanocortine auf den arteriellen Blutdruck untersucht. Es zeigte sich, dass die Prävalenz für arterielle Hypertonie bei den MC4-R defizienten Probanden deutlich geringer war als in der Kontrollgruppe mit funktionsfähigem Melanocortinrezeptor. Die Infusion eines MC4-R Agonisten führte nach 24 Stunden in beiden Gruppen zu einem signifikanten Anstieg des systolischen und diastolischen Blutdruckes. Diese Tatsache könnte durch den Einfluss des melanocortinergen Systems auf das sympathische Nervensystem erklärt werden (Greenfield et al., 2009).

Bei einem Kollektiv an Probanden mit funktioneller MC4-Rezeptormutation konnte sogar eine negative Korrelation zwischen der MSNA und dem Body-Mass-Index sowie den Leptinleveln aufgezeigt werden. Was bedeutet, dass die Probanden mit dem höchsten BMI die geringste muskuläre sympathische Nervenaktivität aufweisen. Dieser inverse Zusammenhang legt nahe, dass der sympathische Outflow zum peripheren Gefäßsystem funktionell auch von dem melanocortinergen System abhängig ist, und erklärt, dass es bei einer MC4-Rezeptordefizienz oder -dysfunktion zu einer geringeren Sympathoexzitation, aber auch zu einer geringeren durch den Sympathikus induzierten Lipolyse kommt (Sayk et al., 2010).

Zur Dokumentation der sympathischen Nervenaktivität haben wir in unseren Versuchen neben Aufzeichnung der Herzfrequenz, des Blutdruckes und der Bestimmung der Plasmakatecholamine auch eine Mikroneurographie des N.peroneus durchgeführt. Weil bisher in Nerven, die das subkutane Fettgewebe innervieren, kein ableitbares lipomotorisches Signal gefunden wurde, das spezifisch die Fettzellen zur Lipolyse stimuliert, haben wir in unserem Experiment die stabil ableitbare muskuläre sympathische

Nervenaktivität gewählt, um sympathoexzitatorische Effekte von MSH/ACTH(4-10) zu untersuchen. Die Ableitung der muskulären sympathischen Nervenaktivität mittels Mikroneurographie ermöglicht die Erfassung intraneuraler, blutdruckregulierender, efferenter sympathischer Nervenaktivität zum Muskelgefäßbett (Hagbarth und Valbo et.al., 1968). Ob sie auch intramuskuläre Lipolyse induziert, ist nicht bekannt.

Mit unseren Methoden konnten wir keinen Anstieg der basalen sympathischen Nervenaktivität nach intranasaler Gabe von MSH/ACTH(4-10) darstellen. Insbesondere konnte kein Anstieg basaler MSNA beobachtet werden und auch die Erfolgsparameter wie arterieller Blutdruck oder Herzfrequenz und die Plasmakatecholamine zeigten keine signifikanten Unterschiede. Auch die Lipolyse im Muskelgewebe blieb unbeeinflusst, was einem sympathischen Einfluss auf das subkutane Fettgewebe nicht widerspricht, da von einer unterschiedlichen Regulation der beiden Geweberegionen auszugehen ist.

Der Einfluss von Proopiomelanocortin, bzw. von Melanocortinen auf die autonome Regulation des kardiovaskulären Systems wurde in mehreren, meist tierexperimentellen, Studien nachgewiesen.

Tierexperimentell gelang im Barorezeptorareal des Hirnstammes der Nachweis von ACTH, α -MSH und Beta-Endorphin. Die Bahnen zwischen den Neuropeptid enthaltenden Zellen im Tractus solitarius führen bis zur ventrolateralen Medulla oblongata und innervieren so vasomotorische bzw. vasodepressorische Areale (Palkovits et al., 1987). Mäuse mit genetisch bedingter Überexpression von α -MSH zeigen, übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, eine gesteigerte Barorezeptorreflexaktivität (Rinne et al., 2008). Bei Menschen führt die intravenöse Injektion von ACTH zu einer Sympathoexzitation (Dodt et al., 1998) während die Gabe von Hydrocortison die muskuläre sympathische Aktivität unterdrückt (Dodt et al., 2000a).

Wir konnten in unseren Versuchen nachweisen, dass es nach pharmakogen induzierter arterieller Hypotension zu einem signifikant stärkeren Anstieg der Burstfrequenz und damit der sympathischen Nervenaktivität nach intranasaler Vorbehandlung mit MSH/ACTH(4-10) kommt.

Für die Wirkung von MSH/ACTH(4-10) auf das sympathische Nervensystem des Menschen ergibt sich auf Grund unserer Untersuchung ein differenziertes Bild.

Während die basale MSNA durch MSH/ACTH(4-10)-Gabe nicht beeinflusst wurde, zeigte sich im Barorezeptortest nach Gabe von Nitroprussid eine erhöhte Stimulierbarkeit der sympathischen Aktivität. Durch die Lokalisierung der sympathischen, efferenten Aktivität zu den Erfolgsorganen kann das nicht die erhöhte Lipolyse im Fettgewebe erklären, weist aber darauf hin, dass das muskuläre sympathische System durch MSH/ACTH(4-10) aktivierbar ist. Da ein lipomotorisches sympathisches Signal bisher nicht identifiziert wurde, ist dieser Befund ein sehr indirekter Hinweis auf die Möglichkeit, dass MSH/ACTH(4-10) auch die efferente sympathische Aktivität zum subkutanen Fettgewebe steigert.

Katecholamine sind in der Regulation der Lipidmobilisation von besonderer Bedeutung. Eine katecholamin-unabhängige Lipolyse ist beschrieben und konnte für atrial natriuretische Peptide (ANP) nachgewiesen werden. ANP-Rezeptoren lassen sich auf Adipozyten von Nagetieren nachweisen. ANP und BNP (brain natriuretic peptide) stimulieren die Lipolyse in isolierten humanen Fettzellen in gleichem Ausmaß wie ein unselektiver beta-Rezeptoragonist (Isoproterenol). In Probandenstudien gelang der Nachweis lipolytischer Effekte im abdominalen weißen Fettgewebe nach Gabe von ANP. Allerdings konnte dies bislang nur im Fettgewebe, nicht aber im Muskel nachgewiesen werden (Lafontan et al., 2008, Lafontan et al., 2000). In der Literatur gibt es derzeit keine Hinweise auf eine Interaktion zwischen ANP und α -MSH, sodass wir die hier aufgezeigten lipolytischen Effekte am ehesten als Folge aktivierter sympathischer Aktivität nach Agonisierung des MC4-Rezeptors durch MSH/ACTH(4-10) sehen.

5.4 Therapeutische Optionen

Das zentrale Melanocortin α -MSH ist einer der wichtigsten endogenen Regulatoren der Energiebalance. Wiederholt zeigten Studien, dass auch sein synthetisches Analogon MTII

zumindest bei normalgewichtigen und adipösen Tieren eine Reduktion des Körpergewichtes und der Nahrungsaufnahme erzielen konnte. Unsere Arbeit bestätigt einen katabolen, lipolytischen Effekt von MSH/ACTH(4-10). Dieser könnte für einen therapeutischen Einsatz der Substanz sprechen, wenn der beobachtete Effekt langfristig anhielte und die Substanz auch bei adipösen Menschen wirkt.

In einer Studie an 500 schwergradig adipösen Probanden erfolgte die Analyse der Nukleotidsequenz des MC4-Rezeptors. Bei 5,8% dieser Gruppe wurden Mutationen im MCR nachgewiesen. Damit ist die Melanocortin 4 Rezeptordefizienz die häufigste monogenetische Form der Adipositas. Phänotypisch zeigt sich eine ausgeprägte Adipositas, ein gesteigertes Größenwachstum, aber auch Hyperphagie und eine schwere Hyperinsulinämie (Farooqi et al., 2003a, Stutzmann et al., 2008). Da zumeist eine heterozygote Erkrankung mit noch einem funktionsfähigen Allel vorliegt, stellt sich hier ein möglicher Ansatzpunkt für weitere Therapiemöglichkeiten bei MC4- Rezeptordefizienz dar.

Limitierend für die Entwicklung derartiger Therapien und für den Langzeiteffekt scheint die rasche Entwicklung einer Tachyphylaxie nach wiederholter Gabe von MC4-Rezeptoragonisten zu sein. Typischerweise entwickelt sich die Tachyphylaxie innerhalb einer Woche nach dauerhaftem Therapiebeginn und äußert sich in einer raschen Abschwächung des Effektes der initial verminderten Nahrungsaufnahme (Zhang et al., 2010). Die nach repetitiver Verabreichung von Melanocortinagonisten eintretende Tachyphylaxie scheint zumindest teilweise durch eine kompensatorische Hochregulation von NPY und AgRP mRNA-Level erklärt (Blüher et al., 2004).

Tierexperimentell zeigte sich in einer Verlaufsstudie über 30 Tage kein Unterschied in der absoluten Gewichtsreduktion zwischen der kontinuierlichen und diskontinuierlichen Gabe von Melanocortinagonisten. Die intermittierende Applikation hält zwar den anorektischen Effekt der Neuropeptide aufrecht, aber sie kann eine Tachyphylaxie auch nicht verhindern. Wohingegen die anorektische Wirkung nach konstanter Gabe von MC4-R Agonisten nach initial aufgetretener Tachyphylaxie im Verlauf rasch abgeschwächt wird.

Ursächlich für die Tachyphylaxie wurde in dieser Studie eine um 25% verminderte Expression der MC4 Rezeptoren beschrieben (Zhang et al., 2010).

5.5 Wirkung von Melanocortinagonisten bei Adipositas

Derzeit wird in der Literatur kontrovers diskutiert, welchen Einfluss Melanocortinrezeptoragonisten auf adipöse Individuen haben.

Tierexperimentell wurde die Auswirkung von Melanotan II auf die Gewichtsabnahme sowie auf die Nahrungsaufnahme in übergewichtigen und normgewichtigen Mäusen untersucht. Die Applikation von Melanotan II führt zu einer deutlich ausgeprägteren Gewichtsabnahme und zu einer stärker verminderten Nahrungsaufnahme bei adipösen Mäusen, im Vergleich zu den Normgewichtigen (Blüher et al., 2004).

Leider scheinen übergewichtige Menschen für den gewichtsreduzierenden Effekt der Melanocortinrezeptoragonisten nicht empfänglich zu sein. In einer Probandenstudie führte die intranasale Gabe bei Normalgewichtigen zu einer signifikanten Gewichtsreduktion, nicht aber bei Adipösen (Hallschmid et al., 2006). Unsere Studie lässt bezüglich des therapeutischen Einsatzes von MSH/ACTH(4-10) keine Aussagen zu, da wir keine langfristige Gabe und auch keine Applikation bei übergewichtigen Patienten untersucht haben. Es ist durchaus möglich, dass bei Adipösen die lipolytische Wirkung von MSH/ACTH(4-10) nicht vorhanden ist oder auch rasch nachlässt. Diesbezüglich sind weitere Untersuchungen erforderlich.

5.6 Limitationen der Studie

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von MSH/ACTH(4-10) auf die Lipolyse und das sympathische Nervensystem bei gesunden, normgewichtigen, sehr sportlichen Männern untersucht. Ausgeschlossen waren dabei Frauen sowie adipöse Männer.

Für weitere Erkenntnisse über den Einfluss von MSH/ACTH(4-10) auf die Gewichtsmodulation wären vergleichbare Studien mit unterschiedlichen Probandenkollektiven, insbesondere mit adipösen Probanden, notwendig.

Experimentelle Studien zeigen, dass sich die sympathoexzitorischen Effekte der Melanocortine durch die medikamentöse Blockade der adrenergen Rezeptoren komplett unterdrücken lassen (Kuo et al., 2004). Unsere Ergebnisse deuten auf eine, durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems induzierte, Lipolyse hin.

Um sicher zu gehen, eine durch Sympathoexzitation induzierte Lipolyse zu messen, wäre es sinnvoll, eine Mikrodialysesonde als Referenz einzulegen, welche mit Adrenorezeptoren blockierenden Medikamenten durchgespült wird, um eine lokale Blockade der Betarezeptoren zu erzielen und somit einen direkten Vergleich zu einer mit Kochsalz gespülten Sonde zu erzielen und so die durch gesteigerte sympathische Nervenaktivität erzielte Lipolyse plausibel erklären zu können.

Bislang ist die Ableitung lipomotorischer Signale im weißen Fettgewebe nicht möglich. Um einen zusätzlichen Parameter für die Aktivierung des sympathischen Nervensystems als Ursache für die gesteigerte Lipolyse aufzeigen zu können, wäre bei einer ausreichenden Menge an Mikrodialysat aus dem weißen Fettgewebe ergänzend eine Bestimmung der Katecholamine denkbar. Die Wiederfindungsraten der Katecholamine im Mikrodialysat bei der von uns gewählten Mikrodialysemembran und Flussgeschwindigkeit sind unklar. Für diese Untersuchung müsste zunächst die Methodik der mikrodialytisch bestimmten Katecholaminkonzentration im subkutanen Fettgewebe evaluiert werden.

Um andere mögliche Mechanismen der Induktion der Lipolyse aufzeigen zu können, hätte eine lokale Messung von ANP im Mikrodialysat durchgeführt werden können, da bekannt ist, dass dieses Peptid eine katecholamin-unabhängige Lipolyse erzielt (Lafontan et al., 2008). Hinweise auf eine Interaktion zwischen ANP und MSH gibt es in der Literatur bislang nicht.

5.7 Klinische Bedeutung und Ausblick

In Deutschland haben insgesamt 47,8% der Erwachsenen einen BMI über 25 und gelten damit als übergewichtig. Davon sind 40% Frauen und 55,7% Männer. Im Vergleich zu 2005 ist die Zahl der Übergewichtigen um 1,2% gestiegen (Ergebnisse des Mikrozensus 2009; Statistisches Bundesamt). Die mit zunehmendem Körpergewicht einhergehenden

Erkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Fettstoffwechselerkrankungen und Artherosklerose rufen immense jährliche Behandlungskosten hervor. Die durch Adipositas verursachten Kosten liegen derzeit bei sechs Prozent aller Krankheitskosten und betragen etwa 15 bis 20 Milliarden Euro pro Jahr (Bundesärztekammer).

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 und ist somit auch von gesundheitsökonomischer Bedeutung.

Das melanocortinerge System spielt eine Schlüsselrolle in der Energiehomöostase und bedarf daher weiterer intensiver Forschung. Da die MC4 Rezeptordefizienz die häufigste monogenetische Ursache für die Adipositas ist und in mehreren Probanden- und tierexperimentellen Studien ein gewichtsreduzierender Effekt nach Applikation von Melanocortinrezeptoragonisten nachgewiesen wurde, wäre die Entwicklung einer gezielten Therapie von großer klinischer Bedeutung.

Unsere Arbeit lässt Schlüsse auf die physiologischen Mechanismen des katabolen Effekts von MSH/ACTH(4-10) zu und ermöglicht dadurch Ansatzpunkte für weitere Forschungen und Therapieansätze der Adipositas.

6 Zusammenfassung

Das melanocortinerge System spielt in der Aufrechterhaltung der Energiebalance eine Schlüsselrolle. Ein gewichtsreduzierender Effekt von intranasal appliziertem MSH/ACTH(4-10) ist beschrieben. Die genauen Mechanismen dieses katabolen Effektes sind bislang nicht geklärt.

In einer doppelblinden, placebokontrollierten Studie an 10 normalgewichtigen, männlichen Probanden wurden die Effekte von intranasal appliziertem MSH/ACTH(4-10) auf die Lipolyse im subkutanen Fett- und Muskelgewebe sowie auf die muskuläre sympathische Nervenaktivität *in vivo* untersucht.

Mittels Mikrodialyse wurden die interstitiellen Konzentrationen von Glycerol, Pyruvat, Laktat und Glukose nach intranasaler Gabe von MSH/ACTH(4-10) bzw. Placebo im subkutanen abdominellen Fettgewebe sowie im Unterarmmuskel gemessen. Gleichzeitig wurde über den Versuchszeitraum die sympathische Nervenaktivität mittels Mikroneurographie abgeleitet. Die medikamentöse Barorezeptorreflextestung mit Nitroprussidnatrium und Phenylephrin erfolgte zum Versuchsende.

Zusammenfassend zeigt meine Arbeit, dass die intranasale Applikation von MSH/ACTH(4-10)

1. innerhalb von 45 min einen Glycerolanstieg im weißen abdominellen Fettgewebe, nicht aber im Muskelgewebe induziert. Dies ist durch einen gewebespezifischen lipolytischen Effekt des Peptids zu erklären.
2. zu keiner Steigerung der basalen muskulären sympathischen Nervenaktivität führt. Auch Plasmakatecholamine, arterieller Blutdruck und Herzfrequenz bleiben unbeeinflusst.
3. zu einer gesteigerten Barorezeptorreflexempfindlichkeit mit einer signifikant höheren Reflexaktivität führt. Dies ist als Zeichen einer zentralen Beeinflussung des sympathischen Nervensystems durch MSH/ACTH(4-10) zu werten.

Die spezifische Antwort nur des subkutanen Fettgewebes sowie der Zeitverlauf der Reaktion nach intranasaler Applikation sprechen dafür, dass MSH/ACTH(4-10) seine Wirkung über zentralnervöse Mechanismen entfaltet.

7 Literaturverzeichnis

Ahima R S, Flier J S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; (11): 327-332.

Arner P. [Obesity may have a genetic background]. *Lakartidningen* 1996; (93): 237-239.

Bahlmann L, Klaus S, Baumeier W, Schmucker P, Raedler C, Schmittinger C A, Wenzel V, Voelckel W, Lindner K H. Brain metabolism during cardiopulmonary resuscitation assessed with microdialysis. *Resuscitation* 2003; (59): 255-260.

Bahlmann L, Klaus S, Heringlake M, Gliemroth J, Meier T, Schmucker P. Microdialysis in abdominal surgery. *Langenbecks Arch Surg* 2002; (386): 499-501.

Bartness T J, Kay S C, Shi H, Bowers R R, Foster M T. Brain-adipose tissue cross talk. *Proc Nutr Soc* 2005; (64): 53-64.

Benoit S C, Air E L, Coolen L M, Strauss R, Jackman A, Clegg D J, Seeley R J, Woods S C. The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci* 2002; (22): 9048-9052.

Benveniste H. Brain microdialysis. *J Neurochem* 1989; (52): 1667-1679.

Bluher S, Ziotopoulou M, Bullen J W, Jr., Moschos S J, Ungsunan L, Kokkotou E, Maratos-Flier E, Mantzoros C S. Responsiveness to peripherally administered melanocortins in lean and obese mice. *Diabetes* 2004; (53): 82-90.

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): 465-474.

- Born J, Lange T, Kern W, McGregor G P, Bickel U, Fehm H L. Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat Neurosci* 2002; (5): 514-516.
- Boston B A, Cone R D. Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. *Endocrinology* 1996; (137): 2043-2050.
- Bouchard C, Perusse L. Genetic aspects of obesity. *Ann N Y Acad Sci* 1993; (699): 26-35.
- Bradley R L, Mansfield J P, Maratos-Flier E. Neuropeptides, including neuropeptide Y and melanocortins, mediate lipolysis in murine adipocytes. *Obes Res* 2005; (13): 653-661.
- Chaurasia C S, Muller M, Bashaw E D, Benfeldt E, Bolinder J, Bullock R, Bungay P M, DeLange E C, Derendorf H, Elmquist W F, Hammarlund-Udenaes M, Joukhadar C, Kellogg D L, Jr., Lunte C E, Nordstrom C H, Rollema H, Sawchuk R J, Cheung B W, Shah V P, Stahle L, Ungerstedt U, Welty D F, Yeo H. AAPS-FDA Workshop White Paper: microdialysis principles, application, and regulatory perspectives. *J Clin Pharmacol* 2007; (47): 589-603.
- Chen A S, Marsh D J, Trumbauer M E, Frazier E G, Guan X M, Yu H, Rosenblum C I, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger J M, Strack A M, Camacho R E, Mellin T N, Nunes C N, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre D E, Chen H Y, Van der Ploeg L H. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet* 2000; (26): 97-102.
- Choi C M, Bennett R G. Laser Dopplers to determine cutaneous blood flow. *Dermatol Surg* 2003; (29): 272-280.
- Chung S, Parks G S, Lee C, Civelli O. Recent updates on the melanin-concentrating hormone (MCH) and its receptor system: lessons from MCH1R antagonists. *J Mol Neurosci* 2011; (43): 115-121.

- Cone R D. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev* 2006; (27): 736-749.
- Correia M L, Haynes W G, Rahmouni K, Morgan D A, Sivitz W I, Mark A L. The concept of selective leptin resistance: evidence from agouti yellow obese mice. *Diabetes* 2002; (51): 439-442.
- Cypess A M, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine A B, Kuo F C, Palmer E L, Tseng Y H, Doria A, Kolodny G M, Kahn C R. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009; (360): 1509-1517.
- Dahyot C, Marchand S, Pessini G L, Pariat C, Debaene B, Couet W, Mimoz O. Microdialysis study of imipenem distribution in skeletal muscle and lung extracellular fluids of *Acinetobacter baumannii*-infected rats. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; (50): 2265-2267.
- Delius W, Hagbarth K E, Hongell A, Wallin B G. Manoeuvres affecting sympathetic outflow in human muscle nerves. *Acta Physiol Scand* 1972; (84): 82-94.
- Dotz C, Keyser B, Molle M, Fehm H L, Elam M. Acute suppression of muscle sympathetic nerve activity by hydrocortisone in humans. *Hypertension* 2000a; (35): 758-763.
- Dotz C, Lonroth P, Fehm H L, Elam M. Intraneural stimulation elicits an increase in subcutaneous interstitial glycerol levels in humans. *J Physiol* 1999; (521 Pt 2): 545-552.
- Dotz C, Lonroth P, Fehm H L, Elam M. The subcutaneous lipolytic response to regional neural stimulation is reduced in obese women. *Diabetes* 2000b; (49): 1875-1879.
- Dotz C, Lonroth P, Wellhoner J P, Fehm H L, Elam M. Sympathetic control of white adipose tissue in lean and obese humans. *Acta Physiol Scand* 2003; (177): 351-357.

- Dotz C, Wallin G, Fehm H L, Elam M. The stress hormone adrenocorticotropin enhances sympathetic outflow to the muscle vascular bed in humans. *J Hypertens* 1998; (16): 195-201.
- Eckberg D L, Fritsch J M. How should human baroreflexes be tested? *News Physiol Sci* 1993; (8): 7-12.
- Elias L L, Huebner A, Metherell L A, Canas A, Warne G L, Bitti M L, Cianfarani S, Clayton P E, Savage M O, Clark A J. Tall stature in familial glucocorticoid deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000; (53): 423-430.
- Enoksson S, Nordenstrom J, Bolinder J, Arner P. Influence of local blood flow on glycerol levels in human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; (19): 350-354.
- Farooqi I S, Keogh J M, Yeo G S, Lank E J, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* 2003a; (348): 1085-1095.
- Farooqi I S, Yeo G S, Keogh J M, Aminian S, Jebb S A, Butler G, Cheetham T, O'Rahilly S. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* 2000; (106): 271-279.
- Farooqi I S, Yeo G S, O'Rahilly S. Binge eating as a phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med* 2003b; (349): 606-609.
- Flechtner-Mors M, Jenkinson C P, Alt A, Adler G, Ditschuneit H H. In vivo alpha(1)-adrenergic lipolytic activity in subcutaneous adipose tissue of obese subjects. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; (301): 229-233.
- Gaetgens, P.: Das Kreislaufsystem, In: Klinke, R., Silbernagl, S. *Lehrbuch der Physiologie*, 4. Auflage, S.166ff, Thieme Verlag, Frankfurt am Main, 2003

- Gantz I, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Miwa H, Munzert G, Watson S J, DelValle J, Yamada T. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem* 1993; (268): 8246-8250.
- Graham M, Shutter J R, Sarmiento U, Sarosi I, Stark K L. Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet* 1997; (17): 273-274.
- Greenfield J R, Miller J W, Keogh J M, Henning E, Satterwhite J H, Cameron G S, Astruc B, Mayer J P, Brage S, See T C, Lomas D J, O'Rahilly S, Farooqi I S. Modulation of blood pressure by central melanocortinergetic pathways. *N Engl J Med* 2009; (360): 44-52.
- Hagbarth, K. E. und Vallbo, A. B. "Pulse and Respiratory Grouping of Sympathetic Impulses in Human Muscle Nerves." *Acta physiol. scand.* (1968):74. 96-108.
- Hagstrom-Toft E, Enoksson S, Moberg E, Bolinder J, Arner P. beta-Adrenergic regulation of lipolysis and blood flow in human skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol* 1998; (275): E909-E916.
- Hallschmid M, Benedict C, Born J, Fehm H L, Kern W. Manipulating central nervous mechanisms of food intake and body weight regulation by intranasal administration of neuropeptides in man. *Physiol Behav* 2004a; (83): 55-64.
- Hallschmid M, Benedict C, Schultes B, Fehm H L, Born J, Kern W. Intranasal insulin reduces body fat in men but not in women. *Diabetes* 2004b; (53): 3024-3029.
- Hallschmid M, Smolnik R, McGregor G, Born J, Fehm H L. Overweight humans are resistant to the weight-reducing effects of melanocortin4-10. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; (91): 522-525.
- Haynes W G, Morgan D A, Djalali A, Sivitz W I, Mark A L. Interactions between the melanocortin system and leptin in control of sympathetic nerve traffic. *Hypertension* 1999; (33): 542-547.

- Hoch M, Eberle A N, Wagner U, Bussmann C, Peters T, Peterli R. Expression and localization of melanocortin-1 receptor in human adipose tissues of severely obese patients. *Obesity (Silver Spring)* 2007; (15): 40-49.
- Hoch M, Hirzel E, Lindinger P, Eberle A N, Linscheid P, Martin I, Peters T, Peterli R. Weak functional coupling of the melanocortin-1 receptor expressed in human adipocytes. *J Recept Signal Transduct Res* 2008; (28): 485-504.
- Holloway G A, Jr., Watkins D W. Laser Doppler measurement of cutaneous blood flow. *J Invest Dermatol* 1977; (69): 306-309.
- Huszar D, Lynch C A, Fairchild-Huntress V, Dunmore J H, Fang Q, Berkemeier L R, Gu W, Kesterson R A, Boston B A, Cone R D, Smith F J, Campfield L A, Burn P, Lee F. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 1997; (88): 131-141.
- Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur J Pharm Sci* 2000; (11): 1-18.
- Illum L. Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions. *J Control Release* 2003; (87): 187-198.
- Keesey R E, Hirvonen M D. Body weight set-points: determination and adjustment. *J Nutr* 1997; (127): 1875S-1883S.
- Klaus S, Heringlake M, Bahlmann L. Bench-to-bedside review: microdialysis in intensive care medicine. *Crit Care* 2004; (8): 363-368.
- Kreier F, Fliers E, Voshol P J, Van Eden C G, Havekes L M, Kalsbeek A, Van Heijningen C L, Sluiter A A, Mettenleiter T C, Romijn J A, Sauerwein H P, Buijs R M. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat--functional implications. *J Clin Invest* 2002; (110): 1243-1250.

- Kristensson K, Olsson Y. Retrograde axonal transport of protein. *Brain Res* 1971; (29): 363-365.
- Kuo J J, da Silva A A, Tallam L S, Hall J E. Role of adrenergic activity in pressor responses to chronic melanocortin receptor activation. *Hypertension* 2004; (43): 370-375.
- Lafontan M, Moro C, Berlan M, Crampes F, Sengenès C, Galitzky J. Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP. *Trends Endocrinol Metab* 2008; (19): 130-137.
- Lafontan M, Sengenès C, Galitzky J, Berlan M, De G, I, Crampes F, Stich V, Langin D, Barbe P, Riviere D. Recent developments on lipolysis regulation in humans and discovery of a new lipolytic pathway. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; (24 Suppl 4): S47-S52.
- Laude D, Elghozi J L, Girard A, Bellard E, Bouhaddi M, Castiglioni P, Cerutti C, Cividjian A, Di R M, Fortrat J O, Janssen B, Karemaker J M, Leftheriotis G, Parati G, Persson P B, Porta A, Quintin L, Regnard J, Rudiger H, Stauss H M. Comparison of various techniques used to estimate spontaneous baroreflex sensitivity (the EuroBaVar study). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; (286): R226-R231.
- Leuenberger U A, Hardy J C, Herr M D, Gray K S, Sinoway L I. Hypoxia augments apnea-induced peripheral vasoconstriction in humans. *J Appl Physiol* 2001; (90): 1516-1522.
- Li W D, Joo E J, Furlong E B, Galvin M, Abel K, Bell C J, Price R A. Melanocortin 3 receptor (MC3R) gene variants in extremely obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; (24): 206-210.
- Lonnroth P, Jansson P A, Fredholm B B, Smith U. Microdialysis of intercellular adenosine concentration in subcutaneous tissue in humans. *Am J Physiol* 1989; (256): E250-E255.

- Ludwig D S, Mountjoy K G, Tatro J B, Gillette J A, Frederich R C, Flier J S, Maratos-Flier E. Melanin-concentrating hormone: a functional melanocortin antagonist in the hypothalamus. *Am J Physiol* 1998; (274): E627-E633.
- Mark A L, Rahmouni K, Correia M, Haynes W G. A leptin-sympathetic-leptin feedback loop: potential implications for regulation of arterial pressure and body fat. *Acta Physiol Scand* 2003; (177): 345-349.
- Martinelli C E, Keogh J M, Greenfield J R, Henning E, van der Klaauw A A, Blackwood A, O'Rahilly S, Roelfsema F, Camacho-Hubner C, Pijl H, Farooqi I S. Obesity due to melanocortin 4 receptor (MC4R) deficiency is associated with increased linear growth and final height, fasting hyperinsulinemia, and incompletely suppressed growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; (96): E181-E188.
- Mergen M, Mergen H, Ozata M, Oner R, Oner C. A novel melanocortin 4 receptor (MC4R) gene mutation associated with morbid obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; (86): 3448.
- Mizuno T M, Kleopoulos S P, Bergen H T, Roberts J L, Priest C A, Mobbs C V. Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 1998; (47): 294-297.
- Moussa N M, Claycombe K J. The yellow mouse obesity syndrome and mechanisms of agouti-induced obesity. *Obes Res* 1999; (7): 506-514.
- Nogueiras R, Wiedmer P, Perez-Tilve D, Veyrat-Durebex C, Keogh J M, Sutton G M, Pfluger P T, Castaneda T R, Neschen S, Hofmann S M, Howles P N, Morgan D A, Benoit S C, Szanto I, Schrott B, Schurmann A, Joost H G, Hammond C, Hui D Y, Woods S C, Rahmouni K, Butler A A, Farooqi I S, O'Rahilly S, Rohner-Jeanrenaud F, Tschop M H. The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *J Clin Invest* 2007; (117): 3475-3488.

- Ochi J, Konishi M, Yoshikawa H. [Morphological evidence for the sympathetic innervation of brown adipose tissue of the rat. A fluorescence and electron microscopic study]. *Z Anat Entwicklungsgesch* 1969; (129): 259-267.
- Ollmann M M, Wilson B D, Yang Y K, Kerns J A, Chen Y, Gantz I, Barsh G S. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 1997; (278): 135-138.
- Palkovits M, Mezey E, Eskay R L. Pro-opiomelanocortin-derived peptides (ACTH/beta-endorphin/alpha-MSH) in brainstem baroreceptor areas of the rat. *Brain Res* 1987; (436): 323-338.
- Palmer J S, Duffy D L, Box N F, Aitken J F, O'Gorman L E, Green A C, Hayward N K, Martin N G, Sturm R A. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet* 2000; (66): 176-186.
- Pelleymounter M A, Cullen M J, Baker M B, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; (269): 540-543.
- Petschke F T, Engelhardt T O, Ulmer H, Piza-Katzer H. [Effect of cigarette smoking on skin perfusion of the hand]. *Chirurg* 2006; (77): 1022-1026.
- Podingbauer, A. and Ekmekcioglu, C. "Regulation der Nahrungsaufnahme: Physiologische Mechanismen und klinische Relevanz." *Journal für Ernährungsmedizin* (1) Ausgabe für Österreich (2005): 22-29.
- Poling J, Rees W, Klaus S, Bahlmann L, Hubner N, Mantovani V, Warnecke H. Myocardial metabolic monitoring with the microdialysis technique during and after open heart surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 2007; (51): 341-346.

- Qu, D., et al., Ludwig, D., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M.A., Cullen, M., Mathes, W., Przypek, J., Kanarek, R., Maratos-Flier, E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380.6571 (1996): 243-47.
- Raffin-Sanson M L, de K Y, Bertagna X. Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions. *Eur J Endocrinol* 2003; (149): 79-90.
- Rahmouni K, Haynes W G, Morgan D A, Mark A L. Selective resistance to central neural administration of leptin in agouti obese mice. *Hypertension* 2002; (39): 486-490.
- Rahmouni K, Haynes W G, Morgan D A, Mark A L. Role of melanocortin-4 receptors in mediating renal sympathoactivation to leptin and insulin. *J Neurosci* 2003; (23): 5998-6004.
- Reaven G M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; (37): 1595-1607.
- Reizes O, Benoit S C, Strader A D, Clegg D J, Akunuru S, Seeley R J. Syndecan-3 modulates food intake by interacting with the melanocortin/AgRP pathway. *Ann N Y Acad Sci* 2003; (994): 66-73.
- Richter, W.O. und von Eckardstein, A.: Ernährung. In: Siegenthaler, W. und Blum, H.E. *Klinische Pathophysiologie*, 9.Auflage, S. 196ff., Thieme Verlag, Zürich, 2006
- Rinne P, Harjunpaa J, Scheinin M, Savontaus E. Blood pressure regulation and cardiac autonomic control in mice overexpressing alpha- and gamma-melanocyte stimulating hormone. *Peptides* 2008; (29): 1943-1952.
- Rosenbaum M, Leibel R L, Hirsch J. Obesity. *N Engl J Med* 1997; (337): 396-407.

- Sayk F, Heutling D, Dodt C, Iwen K A, Wellhoner J P, Scherag S, Hinney A, Hebebrand J, Lehnert H. Sympathetic function in human carriers of melanocortin-4 receptor gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; (95): 1998-2002.
- Seeley R J, Yagaloff K A, Fisher S L, Burn P, Thiele T E, van D G, Baskin D G, Schwartz M W. Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature* 1997; (390): 349.
- Shimada M, Tritos N A, Lowell B B, Flier J S, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 1998; (396): 670-674.
- Song C K, Jackson R M, Harris R B, Richard D, Bartness T J. Melanocortin-4 receptor mRNA is expressed in sympathetic nervous system outflow neurons to white adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; (289): R1467-R1476.
- Starke, K.: Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme. In: Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie, 9.Auflage, S179ff, Elsevier/Urban und Fischer, Freiburg im Breisgau, 2004
- Strader A D, Shi H, Ogawa R, Seeley R J, Reizes O. The effects of the melanocortin agonist (MT-II) on subcutaneous and visceral adipose tissue in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; (322): 1153-1161.
- Stutzmann F, Tan K, Vatin V, Dina C, Jouret B, Tichet J, Balkau B, Potoczna N, Horber F, O'Rahilly S, Farooqi I S, Froguel P, Meyre D. Prevalence of melanocortin-4 receptor deficiency in Europeans and their age-dependent penetrance in multigenerational pedigrees. *Diabetes* 2008; (57): 2511-2518.
- Sundlof G, Wallin B G. The variability of muscle nerve sympathetic activity in resting recumbent man. *J Physiol* 1977; (272): 383-397.
- Tamisier R, Nieto L, Anand A, Cunningham D, Weiss J W. Sustained muscle sympathetic activity after hypercapnic but not hypocapnic hypoxia in normal humans. *Respir Physiol Neurobiol* 2004; (141): 145-155.

- Tritos N A, Maratos-Flier E. Two important systems in energy homeostasis: melanocortins and melanin-concentrating hormone. *Neuropeptides* 1999; (33): 339-349.
- Ungerstedt U, Pycock C. Functional correlates of dopamine neurotransmission. *Bull Schweiz Akad Med Wiss* 1974; (30): 44-55.
- Van der Ploeg L H, Martin W J, Howard A D, Nargund R P, Austin C P, Guan X, Drisko J, Cashen D, Sebhat I, Patchett A A, Figueroa D J, DiLella A G, Connolly B M, Weinberg D H, Tan C P, Palyha O C, Pong S S, MacNeil T, Rosenblum C, Vongs A, Tang R, Yu H, Sailer A W, Fong T M, Huang C, Tota M R, Chang R S, Stearns R, Tamvakopoulos C, Christ G, Drazen D L, Spar B D, Nelson R J, MacIntyre D E. A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; (99): 11381-11386.
- Vergoni A V, Schioth H B, Bertolini A. Melanocortins and feeding behavior. *Biomed Pharmacother* 2000; (54): 129-134.
- Wallin B G, Fagius J. Peripheral sympathetic neural activity in conscious humans. *Annu Rev Physiol* 1988; (50): 565-576.
- Wellhoner 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; (291): E1025-E1030.
- Wilson T E, Kuipers N T, McHugh E A, Ray C A. Vestibular activation does not influence skin sympathetic nerve responses during whole body heating. *J Appl Physiol* 2004; (97): 540-544.
- Xue B, Moustaid N, Wilkison W O, Zemel M B. The agouti gene product inhibits lipolysis in human adipocytes via a Ca²⁺-dependent mechanism. *FASEB J* 1998; (12): 1391-1396.

- Yasuda T, Masaki T, Kakuma T, Yoshimatsu H. Hypothalamic melanocortin system regulates sympathetic nerve activity in brown adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; (229): 235-239.
- Yaswen L, Diehl N, Brennan M B, Hochgeschwender U. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 1999; (5): 1066-1070.
- Yeo G S, Farooqi I S, Aminian S, Halsall D J, Stanhope R G, O'Rahilly S. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 1998; (20): 111-112.
- Yeo G S, Lank E J, Farooqi I S, Keogh J, Challis B G, O'Rahilly S. Mutations in the human melanocortin-4 receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanisms. *Hum Mol Genet* 2003; (12): 561-574.
- Zeitlinger M, Muller M, Joukhadar C. Lung microdialysis--a powerful tool for the determination of exogenous and endogenous compounds in the lower respiratory tract (mini-review). *AAPS J* 2005; (7): E600-E608.
- Zhang Y, Collazo R, Gao Y, Li G, Scarpace P J. Intermittent MTII application evokes repeated anorexia and robust fat and weight loss. *Peptides* 2010; (31): 639-643.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman J M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; (372): 425-432.
- Zografos G C, Martis K, Morris D L. Laser Doppler flowmetry in evaluation of cutaneous wound blood flow using various suturing techniques. *Ann Surg* 1992; (215): 266-268.

Elektronische Datenbanken

Statistisches Bundesamt, www.destatis.de; Tag des Zugriffs 19.09.2011

Bundesärztekammer: www.bundesaerztekammer.de; Tag des Zugriffs 19.09.2011

Perimed Instruments: www.perimed-instruments.com; Tag des Zugriffs 23.11.2011

8 Anhang

Liste verwendeter Materialien

ACTH Immunoassay	IMMULITE®ACTH, DPC®, Los Angeles, USA
CMA Perfusion Fluid T1®	CMA/Microdialysis AB, Stockholm, Schweden
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
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 11.0, 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

Tabelle 4: Daten von Glucose, Laktat, Glycerol und Pyruvat aus dem Mikrodialysat des weißen abdominalen Fettgewebes, in mmol/l und SD.

Minuten	Glucose				Laktat				Glycerol				Pyruvat			
	MSH/ACTH (4-10)		Placebo		MSH/ACTH (4-10)		Placebo		MSH/ACTH (4-10)		Placebo		MSH/ACTH (4-10)		Placebo	
	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	
0	2,74	1,69	2,70	1,22	0,61	0,36	0,75	0,47	74,00	76,80	103,00	48,11	47,33	35,97	47,88	33,51
15	2,87	1,48	2,61	1,00	0,89	0,47	0,83	0,58	138,88	212,20	107,00	67,20	63,63	36,85	46,00	31,63
30	3,24	2,22	2,57	1,08	1,01	0,76	0,97	0,60	89,11	52,90	115,75	76,14	54,00	41,97	49,88	29,99
45	2,57	1,50	2,51	0,92	0,75	0,51	0,99	0,47	123,70	138,39	127,38	75,86	55,50	33,32	52,50	26,45
60	3,20	1,86	2,79	1,11	0,94	0,74	1,14	0,55	103,56	87,98	132,38	74,17	59,80	32,99	55,25	30,32
75	2,97	1,52	2,62	1,08	0,84	0,55	1,07	0,44	144,30	134,66	134,13	68,74	57,30	30,91	52,50	26,60
90	2,34	1,49	2,85	1,09	0,77	0,55	1,14	0,48	134,44	115,27	143,75	62,50	49,00	33,67	56,75	28,99
105	2,80	1,38	2,77	1,03	0,88	0,51	1,09	0,41	140,75	96,82	130,75	58,72	55,88	30,46	54,00	26,73
120	2,71	1,27	2,87	1,17	0,87	0,50	1,12	0,47	148,13	106,40	135,38	64,75	55,13	29,45	56,88	27,26
135	2,78	1,39	2,77	1,03	0,82	0,48	1,06	0,38	151,25	108,30	139,13	62,01	55,38	30,98	54,38	25,49
150	2,77	1,34	2,81	1,13	0,83	0,41	1,04	0,41	146,13	96,83	144,43	57,97	53,13	25,21	60,57	24,08

Tabelle 5: Daten von Glucose, Laktat, Glycerol und Pyruvat aus dem Mikrodialysat des Muskelgewebes, in mmol/l und SD

Minuten	Glucose				Laktat				Glycerol				Pyruvat			
	MSH/ACTH (4-10)		Placebo		MSH/ACTH (4-10)		Placebo		MSH/ACTH (4-10)		Placebo		MSH/ACTH (4-10)		Placebo	
	SD		SD	SD		SD		SD	SD		SD	SD		SD		SD
0	2,74	1,23	2,38	0,93	1,32	0,84	1,52	0,60	48,80	19,27	60,63	16,47	23,50	21,09	25,00	20,31
15	3,33	1,04	2,52	0,36	1,67	1,02	1,78	0,56	45,00	18,28	46,63	19,99	36,38	23,54	35,57	20,02
30	3,11	1,20	2,51	0,27	1,38	0,76	1,89	0,48	55,90	35,11	41,88	16,69	37,89	24,49	39,88	18,79
45	2,95	0,96	2,46	0,25	1,50	0,71	1,95	0,47	54,90	29,73	43,13	14,15	47,00	26,12	45,88	17,59
60	3,26	0,88	2,44	0,25	1,73	0,92	1,67	0,83	58,00	32,37	43,88	16,26	58,22	35,07	50,50	18,12
75	3,21	1,00	2,50	0,23	1,74	1,07	1,96	0,61	45,60	19,04	44,38	16,28	61,89	35,31	53,75	19,76
90	2,52	0,44	2,60	0,13	1,98	0,57	2,06	0,48	51,25	24,32	49,00	16,61	71,25	30,34	59,63	22,90
105	2,59	0,24	2,51	0,32	1,99	0,56	2,00	0,49	49,75	21,84	46,75	18,45	75,00	26,86	58,00	19,06
120	2,49	0,29	2,49	0,31	1,99	0,62	2,08	0,42	50,38	24,70	47,75	19,35	78,13	24,07	65,50	20,93
135	2,57	0,34	2,46	0,35	2,10	0,68	2,10	0,45	52,88	26,89	48,50	20,13	84,63	25,87	67,88	22,62
150	2,61	0,29	2,66	0,42	2,11	0,55	2,03	0,76	53,25	20,81	55,86	15,72	91,38	30,30	74,00	24,83

Probandenaufklärung

Sehr geehrte Probanden,

hiermit möchten wir Sie über unseren Versuchsablauf aufklären und die Sie betreffenden Anforderungen und eventuelle Risiken erläutern.

Unsere Versuchsplanung sieht drei Versuchstage vor, zwischen denen jeweils drei versuchsfreie Wochen liegen müssen. Ein Versuchstag dauert ca. vier bis sechs Stunden. Wir wollen mittels Mikrodialyse den Stoffwechsel im Fett- und Muskelgewebe kontrollieren. Hierfür werden wir jeweils eine Mikrodialysemembran (feiner Plastikschlauch) in den Unterarmmuskel und eine in das Unterhautfettgewebe des Bauches platzieren.

Zusätzlich wird noch eine feine Nadel in das Unterhautfettgewebe des Bauches gelegt, mit der per Laserstrahl die Flussgeschwindigkeit des Blutes in der Umgebung der Mikrodialyse überwacht werden soll. Sie erhalten eine Venenverweilkanüle in einem Arm, über die dann im Laufe des Versuches insgesamt ca. 150 ml Blut abgenommen wird. Über diese Nadel wird gleichzeitig eine Kochsalzlösung infundiert, um Ihnen ausreichend Flüssigkeit zukommen zu lassen.

Weiter werden Sie mit einer Blutdruckmanschette, einem EKG und einem Atemexkursionsgurt an einem Monitor angeschlossen.

Dann wird mit einer feinen Elektrode die Muskelaktivität im linken Unterschenkel geprüft und ebenfalls auf dem Monitor dargestellt. Dieses Verfahren ist nicht schmerzhaft.

Diese Vorbereitungen sollten innerhalb der ersten 1,5 Stunden abgeschlossen sein, dann beginnt der Versuch mit der Applikation von MSH/ACTH(4-10) oder dem Placebo in Form eines Nasensprays. Die Studie ist doppelt verblindet.

In den folgenden drei Stunden wird halbstündlich Blut abgenommen.

Nach drei Stunden wird abschließend einmal Nitroprussidnatrium und einmal Phenylephrin in tausendfacher Verdünnung appliziert um den Blutdruck erst um etwa

15mmHg zu senken und dann um 15mmHg zu erhöhen. Von dieser Applikation merkt der Proband normalerweise nichts.

Risiken:

Die Risiken, die mit dieser Methode der Stoffwechselformung verbunden sind, kann man als sehr gering einzuschätzen.

Die Applikation von MSH/ACTH(4-10) kann unter Umständen zu Unverträglichkeitsreaktionen führen.

In den seltensten Fällen kann es zu Blutungen, Infektionen oder Nervenverletzungen im Bereich der Einstichstellen kommen.

Wenn Sie noch weitere Fragen zu unserem methodischen Vorgehen haben, können Sie sich gerne an den betreuenden Arzt Dr. Wellhöner wenden. Mit Ihrer Unterschrift bestätigen Sie, dass Sie ausreichend über die Versuchsdurchführung aufgeklärt worden sind. Sie erklären sich unter Kenntnisnahme dieser Probandenaufklärung einverstanden an unserem Versuch teilzunehmen.

Ethikvotum

Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft und mit dem Schreiben vom 03.02.2004 als ethisch unbedenklich eingestuft (Aktenzeichen 04-006).

Danksagung

Die Auswahl des Themas erfolgte durch Herrn Prof. Dr. med. Christoph Dodt, dem ich für die Bereitstellung des Themas und die aktive, lebhafte und herzliche Betreuung danke.

Mein ganz besonderer Dank gilt zudem Dr. med. Peter Wellhöner, der mich während der praktischen Durchführung, bei der Auswertung der Daten sowie beim Schreiben und Korrigieren der Arbeit mit vielen Anregungen unterstützt hat. Beide haben durch ihre angenehme Art und ständige Bereitschaft die Durchführung der Versuche erleichtert und erheitert.

Zudem möchte ich Dr. med. Friedhelm Sayk und Dr. med. Jan Struck für die Unterstützung in der Durchführung der MSNA danken.

Ein großer Dank gilt Martina für die Analyse der Proben.

Friederike Jacobs danke ich für die freundschaftliche Unterstützung in der Durchführung der Versuche.

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

Dankbar bin ich meinen Freunden für die Korrekturen und die entscheidende Hilfestellung beim Layout.

Meinen Eltern bin ich sehr dankbar für die Unterstützung und Motivation sowie für die Geduld die sie mir in der Fertigstellung dieser Arbeit entgegengebracht haben.