Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Die Wirkung des 5-HT_{1A}-Agonisten 8-OH-DPAT auf die Serotoninfreisetzung im lateralen Hypothalamus und das Fressverhalten der Ratte: Eine *in vivo*-Mikrodialyse-Studie

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Frederike Bianca Kienzle
aus Ludwigsburg

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Morgenstern

2. Prof. Dr. rer. nat. H. Jarry

3. Prof. Dr. med. N.-C. Juhr

Datum der Promotion: 15. Juli 2002

Abstract: Serotonin (5-HT) nimmt eine wichtige Rolle in der Regulation von Nahrungsaufnahme ein. Erhöhte 5-HT-Freisetzung hemmt die Nahrungsaufnahme. Der 5-HT_{1A}-Rezeptor liegt sowohl somatodendritisch als auch postsynaptisch vor. Seine Stimulation mit 8-OH-DPAT vermindert die 5-HT-Freisetzung. Die *in-vivo*-Mikrodialyse ermöglichte uns eine kontinuierliche Messung von extrazellulärem 5-HT im lateralen Hypothalamus an der frei beweglichen Ratte. Unsere Ergebnisse zeigen einen Abfall der 5-HT-Freisetzung bei satten Ratten, nicht jedoch wenn diesen nach Substanzgabe Futter angeboten wurde. Bei hungrigen Ratten war nach Substanzgabe keine signifikante Veränderung in der 5-HT-Freisetzung zu messen. Zusammenfassend wird mit der vorliegenden Studie erstmals die Wirkung von 8-OH-DPAT auf die 5-HT-Freisetzung im LHA in Abhängigkeit von unterschiedlichen Motivationszuständen in Verbindung mit Nahrungsaufnahme gezeigt.

Schlagworte: Serotonin, Hypothalamus, Fressverhalten, Mikrodialyse

Abstract: Serotonin (5-HT) is an important mediator of satiety. Increase of 5-HT release inhibits food intake. 8-OH-DPAT, an agonist at the somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptor, reduces serotonergic activity and induces food intake. With the technique of in vivo microdialysis we were able to measure continuously extracellular 5-HT in the lateral hypothalamic area (LHA) in freely moving rats under different feeding conditions. The present results show a decrease of 5-HT release in freely feeding rats after administration of 8-OH-DPAT. This effect was not obtained when offering food after drug application. In contrast, no significant effect in 5-HT release after application of 8-OH-DPAT in food deprived rats was measured. In summery this study demonstrates the effect of 8-OH-DPAT on the 5-HT release in LHA of freely moving rat depending on the different feeding conditions.

Keywords: Serotonin, Hypothalamus, Feeding behaviour, Microdialysis

1 EINLEITUNG

1.1 Vorbemerkungen zur Nahrungsaufnahme

Das Körpergewicht wird reguliert durch ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme von Nahrung (Verhaltensvorgang) und Verstoffwechselung und Speicherung von Nahrung (physiologischer Vorgang). Diese Balance des natürlichen Nahrungsprozesses lässt sich vereinfacht als ein Kreislauf beschreiben: Wahrgenommener Hunger motiviert zur Nahrungsaufnahme und dieser wiederum folgt ein Sättigungsgefühl. Die aufgenommene Nahrung wird verdaut, die dem Körper zugeführte Energie verbraucht oder gespeichert, nach einigen Stunden schließt sich der Kreis von neuem.

Die wesentliche Regulation dieser Vorgänge erfolgt über das Gehirn. Weitere modulierende Komponenten des komplexen Systems sind Neurotransmitter, verschiedene Peptide und Hormone.

Gegenwärtig wird dem klassischen homöostatischen Modell ein offenes System gegenüber gestellt, das periphere Signale und Modulationen aufnimmt und in zentralen Schaltstellen koordiniert. Feste Stellgrößen werden im Sättigungs-Hunger-Prozess nicht mehr postuliert (in Logue, 1998). Die große Publikationszahl zu diesem Thema verdeutlicht die aktuellen Bestrebungen, die Vielzahl an bislang erforschten beteiligten zentralen und peripheren Strukturen in ein Gesamtkonzept zu integrieren.

Auch für die Erklärung pathologischer Veränderungen im Essverhalten beim Menschen ist das homöostatische Modell nicht mehr ausreichend. Entgleisungen in der Regulation des Körpergewichts sind sowohl auf der Verhaltens- als auch auf der physiologischen Ebene zu suchen.

Die Essstörungen sind in Genese und Symptomatik sehr verschieden ausgeprägt. Gemeinsam ist ihnen der pathologische Umgang mit Nahrung, die ständig kreisenden Gedanken um Essen, die extreme Ernährungsweise, die sich als Exzesse oder komplette Nahrungsverweigerung äußern. Diese Entgleisungen können lebensbedrohliche körperliche und psychische Störungen zur Folge haben.

Zu den Störungen des Ernährungsverhaltens zählen die Fettsucht, Anorexia nervosa und Bulimia nervosa. Anfangs wurden sie zu Persönlichkeitsstörungen

oder Neurosen gezählt. Inzwischen werden Anorexia und Bulimia nervosa in den internationalen Klassifikationen als eigenständige Krankheiten erfasst (Dilling, 1999).

Alle drei Krankheitsgruppen treten typischerweise mit hoher Inzidenz in Ländern der Industrienationen mit hohem ökonomischem Lebensstandard auf. Das globale Ungleichgewicht im Kalorienverbrauch in Verbindung mit Veränderungen der Arbeits- und Freizeitgewohnheiten hat sich seit Beginn des 20. Jahrhunderts gravierend verschärft. In den westlichen Industrienationen führte dies teilweise zu Überernährung exzessiven Ausmaßes.

Ebenfalls auffallend ist die wesentlich höhere Erkrankungsrate von Mädchen und Frauen als die von Männern. Hormonelle und metabolische Ursachen werden zur Erklärung herangezogen. Ein deutlicher Einfluss auf den psychopathologischen Prozess der Essstörungen geht jedoch auch vom gesellschaftlich vermittelten Körperideal aus. So kehrte sich die positive Relation zwischen Übergewichtigkeit und sozialem Status im Laufe der „Zivilisation“ um. Damit veränderte sich auch die Beurteilung seitens der Gesellschaft, in der Untergewicht inzwischen ein Kriterium für das weibliche Schönheitsideal ist.

In der Entwicklung von Essstörungen sind somatische und psychische Ursachen zu suchen. Infolgedessen muss der Ansatz der wissenschaftlichen Erklärungsmodelle ganzheitlich sein. Konkret für die Therapie bedeutet dies die Kombination psychotherapeutischer, pharmakologischer und internistischer bzw. chirurgischer Methoden.

Im Folgenden werden die Formen der Essstörungen kurz dargestellt:

Die **Anorexia nervosa** oder Magersucht wird unter Schulmädchen in den USA mit einer Prävalenz von 1 % angesetzt (Lucas, 1991). Sie stellt die älteste der in der Literatur beschriebenen Essstörungen dar. Im Vordergrund steht die „Sucht“ nach Gewichtsreduktion, die eine extreme Diät bis hin zur vollständigen Verweigerung von Nahrung und Flüssigkeit zur Folge hat. Psychodynamisch erklärt sich die nach außen hin sichtbare Essstörung durch das kindliche Streben nach Selbstkontrolle und Autonomie. Im Gegensatz zu sekundär anorektischen Symptomen bei schweren organischen oder psychotischen Erkrankungen ist der Appetit bei Patientinnen mit Anorexia nervosa oft nicht reduziert. Somit ist eher eine Störung in der „Sättigung“ als im „Hunger“ als pathologisches Modell zu diskutieren. Die

Patientinnen zeigen typischerweise eine gestörte Wahrnehmung ihres Körperschemas und sind in der Regel nicht oder erst sehr spät krankheitseinsichtig. Die Mortalitätsrate unter diagnostizierten Frauen mit Anorexia nervosa beträgt bis zu 18 %.

Im Zusammenhang mit der Gewichtsreduktion vorausgehenden oder folgenden Amenorrhoe und pathologischen Hormonspiegeln von Gonadotropinen, Schilddrüsen- und Wachstumshormonen wurde eine Beteiligung hypothalamischer Strukturen vermutet. Ebenfalls wurde in Gehaltsbestimmungen *post mortem* eine verminderte Anzahl serotonerger Neurone im ZNS gefunden. *In vivo* wurde eine verminderte Serotonin (5-HT)-Synthese und 5-HT-Wiederaufnahme nachgewiesen (Zemishlany et al., 1987). Allerdings ist noch unklar, ob der niedrige 5-HT-Spiegel der Erkrankung ursächlich vorausgeht oder ein sekundärer Effekt durch chronischen Mangel an Nahrungssubstrat vorliegt.

Die **Bulimia nervosa**, zunächst als Variante der Magersucht verstanden (Russell, 1979), zeigt unter 16- bis 40-jährigen Frauen in den USA eine Prävalenz von 1-2 %. Die Betroffenen, meist älter als anorektische Patientinnen, leiden typischerweise an einer zwanghafte Beschäftigung mit der Nahrungsaufnahme. Es kommt zu unkontrollierten Essattacken, denen typischerweise selbstinduziertes Erbrechen folgt, was einen Circulus vitiosus von extremer Magenentleerung und Magenfüllung auslöst. Der Kreislauf wird häufig durch Missbrauch von Laxantien, übertriebene sportliche Betätigung oder andere Methoden zur Gewichtsreduktion erweitert. Gravierende lebensbedrohliche Gesundheits-schädigungen treten durch Stoffwechselentgleisungen auf, an erster Stelle durch Elektrolytverluste. Die Bulimie ist signifikant häufig mit Depressionen vergesellschaftet, was den Einsatz von klassischen Antidepressiva und Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (SSRI) in neueren pharmakologischen Therapiemodellen erklärt (Brownell und Fairburn, 1995; Halford und Blundell, 2000a).

Auch bei der Bulimia nervosa liegen experimentelle Ergebnisse zum serotonergen System vor. Nach Brewerton et al. (1992) zeigte sich eine reduzierte Sensitivität der postsynaptischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren, über die u.a. hormonelle Regulationen von Corticosteroiden, Wachstumshormon und Prolaktin vermittelt werden. Eine wichtige Rolle scheint letztgenanntes Hormon in Zusammenhang mit 5-HT und der gemeinsamen hypothalamisch-hypophysiären Achse bei der Bulimia nervosa zu spielen (Brewerton et al., 1992; Jimerson, 1990).

Als letzte und prozentual bedeutendste Gruppe ist die **Fettsucht** zu nennen. Ergebnisse epidemiologischer Studien geben an, dass fast jeder zweite Bundesbürger zwischen 25 und 69 Jahren übergewichtig ist. Die Prävalenz der Adipositas beträgt in Deutschland 17-19 % (Wirth, 1998). Die weltweiten Ausgaben für die Adipositas-Therapie belaufen sich auf über 15 Billionen DM. In Deutschland liegt der Anteil an den gesamten Behandlungskosten bei etwa 5,4 %, wobei die Ausgaben für durch Adipositas mitbedingte Krankheiten nicht einbezogen sind.

Index für das Normgewicht ist der Body Mass Index (BMI), der Quotient aus Körpergewicht in kg und (Körpergröße in m)^2. Der BMI für Normalgewicht wird mit 18.5-24.9, für Präadipositas oder Übergewicht mit 25-29.9, für die eigentliche Adipositas der Grade I-III zwischen 30 und 40 festgesetzt. Die Adipositas ist eine chronische Krankheit, die erwiesenermaßen mit einer Verkürzung der Lebenserwartung einher geht und eine kontinuierliche Behandlung erfordert (Wirth, 1998).

Die Verbindung von Adipositas mit verminderter Glucosetoleranz bzw. Diabetes mellitus Typ 2, Dyslipoproteinämie, essentieller Hypertonie und Hyperurikämie ist seit Ende der 60er Jahre als „Metabolisches Syndrom“ oder „Reaven Syndrom“ in Literatur und Klinik eingegangen (in Wirth, 1998; Unger und Orci, 2001). Das hohe Morbiditätsrisiko für zerebrale, koronare und periphere Gefäßkrankheiten determiniert den Krankheitsverlauf wesentlich.

Die Gewichtsreduktion zur Verhinderung oder Bekämpfung der körperlichen Folgeschäden stellt das vorrangige Therapieziel dar. Nur die radikale Veränderung der Nahrungszusammensetzung, Essgewohnheiten und allgemeinen Lebensweise kann die Krankheit ursächlich angehen.

Für eine medikamentöse Behandlung der Essstörungen fehlen trotz langjähriger Forschungsarbeit noch immer wissenschaftlich gesicherte Studien an ausreichend großen Patientenkollektiven. Die Involvierung serotonerger Mechanismen in die Pathophysiologie der Essstörungen bestätigt sich jedoch in Studien der letzten Jahre (in Ellrott, 2000).

Katecholaminerge Substanzen, vor allem Amphetamine wie Fenproporex, wurden anfangs als Appetitzügler verwendet. Wegen der zentral stimulierenden und der kardiovaskulären Nebenwirkungen, vor allem aber wegen des Suchtpotentials,

sind Amphetamine nicht mehr für die Behandlung von Essstörungen indiziert. Bereits in den späten 80er-Jahren wurden an Kliniken erfolgreiche Therapien bei Übergewicht mit den serotonerg wirkenden Substanzen *d*-Fenfluramin und Fluoxetin durchgeführt (in Ellrott, 2000; Halford und Blundell, 2000a).

Die Ergebnisse einer anhaltenden Gewichtsreduktion nach *d*-Fenfluramin-Gabe bei Adipositas wurden auf einen schnelleren Eintritt der Sättigung durch seine Wirkung als 5-HT-Wiederaufnahmehemmer sowie als -Freisetzer zurückgeführt (Finer, 1992). Allerdings mussten sowohl Fenfluramin als auch *d*-Fenfluramin wegen ihrer starken kardiopulmonalen Nebenwirkungen vom Markt genommen werden (Wechsler, 1998, Glazer, 2000).

Fluoxetin gehört in die Gruppe der SSRI und ist als Antidepressivum bekannt. Bei bulimischen Patienten zeigte sich nach Substanzgabe eine Normalisierung des Essverhaltens. Fluoxetin ist in der Behandlung der Bulimia nervosa zugelassen und indiziert, wobei die medikamentöse Therapie nur in Verbindung mit Psychotherapie erfolgen darf. Der Einsatz in der Therapie der Anorexia nervosa wird nach anfänglich positiven Ergebnissen inzwischen nicht mehr empfohlen (in Kaye,1997).

In Studien mit Fluoxetin und Nisoxetin, einem selektiven Noradenalin (NA)-Wiederaufnahmehemmer, konnte belegt werden, dass nur eine Kombinationstherapie effektiv hypophagisch wirkte. Dies führte zur Entwicklung einer Substanz, die sowohl die Katecholamin- als auch die 5-HT-Wiederaufnahme hemmte. Als neues Pharmakon erfüllte Sibutramin dieses Profil. Der Wirkmechanismus über beide Transmittersysteme basiert auf der serotonerg vermittelten postprandialen Sättigung und reduzierten Energieaufnahme und dem noradrenerg vermittelten Abbau von viszeraler Fettmasse und verstärkter Thermogenese. In klinischen Studien der späten 90er-Jahre wurde Sibutramin mit Erfolg zur Reduktion des Gewichts und der weiteren Risikofaktoren des metabolischen Syndroms erprobt (Astrup, 1998). Die Wirkung erstreckt sich auf normalgewichtige und adipöse Probanden und zeigt eine additive Wirkung zu Diäten. Weder eine Neurotoxizität, noch Suchtverhalten konnten bislang gezeigt werden (Jackson et al., 1997), allerdings ist der Einsatz bei pathologischen Blutdruckwerten kontraindiziert (Leferink, 1999). In den USA ist Sibutramin unter dem Handelsnamen Meridia®, in Deutschland als Reductil® seit 1998 inzwischen

ebenfalls zugelassen.

Inzwischen wird Orlistat, auch als Xenical® bekannt, ein Inhibitor der Pankreaslipase, in klinischen Adipositas-studien am Menschen erfolgreich eingesetzt (in Ellrott, 2000). Die Substanz wirkt über eine Assimilationshemmung der aufgenommenen Nahrung im Darm. Orlistat ist für die Adipositastherapie in Verbindung mit einer Fett-Reduktionsdiät zugelassen und zeigt eine Reduktion des Körpergewichts bis 15 % in einem Jahr (Leferink, 1999). Wegen der Steatorrhöe kann es unter Langzeitbehandlung zu Mangelerscheinungen der fettlöslichen Vitamine kommen. Aktuelle Forschungsarbeiten stellen die Entwicklung von Antagonisten der erst 1998 entdeckten Peptide Orexin-A und Orexin-B als Gewichtsreduktoren in Aussicht (in Halford und Blundell, 2000a).

1.2 Beteiligte Strukturen und Botenstoffe bei der Regulation der Nahrungsaufnahme

Das Körpergewicht wird reguliert durch die Bilanz aus aufgenommenen Nahrungsbausteinen und verbrauchter Energie. Diese wird nicht auschließlich durch exogene Faktoren, wie Zusammensetzung der Grundnahrungsmittel Fette, Kohlenhydrate und Proteine oder körperliche und geistige Aktivität beeinflusst. Körpereigene Peptide, Monoamine und Hormone haben an der Regulation von Hunger und Sattheit, sowie an der Verwertung der Nahrung wesentlichen Anteil.

Unterschieden wird zwischen stimulierenden und hemmenden Einflüssen auf die Nahrungsaufnahme. Dabei wirken als klassische Stimulantien Opioide und Cannabis, neuere Substanzen sind Neuropeptid Y (NPY), Galanin, Orexin und melaninkonzentrierendes Hormon (MCH) (Leibowitz, 1995; Leibowitz und Alexander, 1998; in Friedman und Halaas, 1998). Hemmend auf die Nahrungsaufnahme wirken vor allem Amphetamine, Serotonin, Cholecystokinin (CCK), Leptin und Bombesin (Blundell und Leshem, 1975; Smith und Gibbs, 1975; Gibbs und Smith, 1989; in Houpt, 2000).

In der Forschung zur Pathogenese von Essstörungen kristallisierten sich zwei Mechanismen heraus: 1. über zentralnervöse Projektionsbahnen und 2. über periphere Botenstoffe vermittelt. Unter den zentral wirkenden Substanzen sind vor allem die katecholaminergen Transmitter Dopamin (DA) und Noradrenalin sowie 5-HT zu nennen (in Parker, 1999). Ein Ungleichgewicht in Produktion, Ausschüttung und Wiederaufnahme dieser Botenstoffe liefert wahrscheinliche Ursachen für entgleiste Reaktionen im Angst-, Aggressions- und im Essverhalten.

Versuche von Anand und Brobeck zeigten bereits 1951, dass Läsionen im ventromedialen Hypothalamus (VMH) zu Hyperphagie und im lateralen Hypothalamus (LH) zu Hypophagie führten. Dies stellte den Hypothalamus erstmals als zentrales Regulationsgebiet in die Diskussion.

Die Beachtung von peripheren, vor allem gastrointestinalen Mechanismen für die Regulation und Fehlregulation von Nahrungsaufnahme entwickelte sich aus der Adipositasforschung im Rahmen der Inneren Medizin. Im Zusammenhang mit der Multimorbidität von Übergewichtigen mit Diabetes mellitus Typ 2, Störungen im Fettsäure- und Lipoproteinhaushalt, Bluthochdruck und koronare Herzkrankheit stieß man auf gastrointestinal wirkende „sättigende" Substanzen (wie CCK, Bombesin, Enterostatin).

Serotonin wirkt sowohl peripher im Magen-Darm-Trakt als auch in zentralnervösen Strukturen. Die bereits erwähnte neu entwickelte Substanz Sibutramin wirkt zentral sättigend. Sibutramin hemmt sowohl die Wiederaufnahme von 5-HT als auch von NA (Jackson et al., 1997). Dies erklärt möglicherweise die potenzierte und über Monate anhaltende klinische Wirksamkeit von Sibutramin in der Therapie von Adipositas (Astrup, 1998).

Neuropeptid Y ist die bislang stärkste beschriebene orexigene Substanz (in Friedman und Halaas, 1998). NPY wurde erstmals von Tatemoto et al. (1982) synthetisiert und stimuliert nach intrahypothalamischer Gabe die Nahrungsaufnahme bei Ratten (Jolicoeur et al., 1995). Diese hyperphage Wirkung von NPY wird durch den serotonerg vermittelten Sättigungseffekt gehemmt, wie in Versuchen mit *d*-Fenfluramin gezeigt werden konnte (Currie und Coscina, 1996). Signifikant erniedrigte hypothalamische NPY-Konzentrationen fanden sich in tumorkranken, anorektischen Ratten, bei adipösen Ratten konnte keine hyperphage Wirkung von appliziertem NPY beobachtet werden (Chance et al., 1994).

Die molekularbiologische Charakterisierung des Gens für Fresssucht bei Mäusen (*ob/ob*) zeigte vor wenigen Jahren, dass dieses Gen das Hormon Leptin kodierte. Dieses neu entdeckte Hormon wird im Fettgewebe und in geringerem Masse im Magenepithel und in der Plazenta exprimiert. Seine Freisetzung ins Plasma erfolgt über spezifische Rezeptoren im Hypothalamus (in Friedman und Halaas, 1998).

Exogenes Leptin reduziert die Futteraufnahme und erhöht den Energieverbrauch

in Versuchen an der frei fressenden Ratte. Ein schwächerer Effekt wurde bei der hochkalorisch ernährten Adipositas-Ratte beobachtet (Clapham et al., 1997).

Endogene Leptinkonzentrationen im humanen Plasma verändern sich nicht kurzfristig nach Nahrungsaufnahme (wie zum Beispiel Glukose, Insulin, CCK), sondern stellen vielmehr eine längerfristige Reaktion des Körpers auf gebildetes Fettgewebe dar. Im Hungerzustand ist die Leptinkonzentration im Plasma vermindert, kontinuierliche Gewichtszunahme erhöht dagegen den Leptinspiegel. Dieser Effekt wurde auch bei Patientinnen mit Anorexia nervosa beobachtet, bei denen der Leptin-Plasmaspiegel positiv mit der Erhöhung des BMIs korrelierte (Nedvidkova et al., 2000). Seit Anfang des Jahres 2001 laufen in den USA erstmals Studien am Menschen, in denen dem während einer Diät niedrigen Leptinspiegel mit einer Leptinsubstitution entgegengewirkt werden soll. Der Stoffwechselumsatz könnte damit stimuliert und eine bessere Gewichtsreduktion unter Diät ermöglicht werden. Eine direkte Interaktion zwischen serotonergem System und Leptin ist unwahrscheinlich. Leptin hemmt jedoch die Wirkung von NPY. Umgekehrt wird die anorektischen Wirkung von Leptin durch CCK potenziert (in Halford und Blundell, 2000b; in Friedman und Halaas, 1998).

In Versuchen zur Erforschung peripherer Sättigungsfaktoren wurden erhöhte Plasma-spiegel des Neuropeptids CCK nach Nahrungsaufnahme und gastrointestinaler Nahrungspassage gefunden (Smith und Gibbs, 1975; In Gibbs und Smith, 1989). Mit der Entdeckung der zwei CCK-Rezeptor-Subtypen A und B (Innis und Snyder, 1980) und der experimentellen Einführung hochpotenter Rezeptorantagonisten wurde der Zusammenhang zwischen peripheren und zentralen Faktoren erstmals evident: CCK_A-Rezeptoren kommen in Pylorus, Pankreas und im ZNS vor. CCK_B-Rezeptoren finden sich im ZNS (Hill und Woodruff, 1990).

Stallone et al. wiesen 1989 nach, dass CCK mit 5-HT interagiert. Aus dieser Interaktion wurde darauf geschlossen, dass der inhibitorische Effekt des Oktapeptids CCK-8 auf die Nahrungsaufnahme von der zentralen serotonergen Aktivität abhängt (Silver und Morley, 1991; Simansky, 1998; Grignaschi et al., 1993). Ergänzend dazu wurden von Voigt et al. (1998) im lateralen Hypothalamus der nahrungskarenten Ratte nach peripherer Gabe von CCK eine erhöhte Freisetzung von 5-HT beobachtet. Eine Beteiligung von $5\text{-}HT_{1A}$-Rezeptoren wird vermutet (Voigt et al., 1998).

Die tierexperimentelle Forschung über physiologisches Essverhalten erfolgt vorwiegend mit Ratten. Die genetisch veränderte Zucker-Ratte (Zucker, 1972) bietet ein Tiermodell, das bis heute in der Untersuchung familiärer Fettsucht beim Menschen große Bedeutung einnimmt (Unger und Orci, 2001). Die Konzentration der Monoamine in verschiedenen Hirnregionen der Zucker-Ratten zeigte deutliche Veränderungen:

5-HT und sein Metabolit 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) wurden in verringerter Konzentration u.a. in Hypothalamus, Hippocampus und Striatum gemessen (Orosco et al. 1986). Neben einer peripheren Hyperinsulinämie und Insulinresistenz zeigte sich bei den Zucker-Ratten ein fehlender Sättigungseffekt nach Insulin-Glukose-Infusion (Orosco et al., 1996). Ebenfalls fand sich bei den adipösen Ratten eine verminderte Empfindlichkeit für den Sättigungseffekt von CCK, NPY (McLaughlin und Clifton, 1980) und Leptin (Friedman und Halaas, 1998).

1.3 Das serotonerge System

1.3.1 Geschichte

Ende des letzen Jahrhunderts hatten Forscher bereits die Existenz einer endogenen Substanz mit vasopressiven Eigenschaften vermutet. 1933 nannten Erpsamer und Kollegen diese Substanz „Enteramin“. Sechs Jahre später konnten Rapport, Green und Page einen „Serum tonisierenden Faktor“, das sogenannte “Serotonin“, isolieren. Rapport gelang 1949 die strukturelle Aufklärung selbiger Substanz als 5-Hydroxy-Tryptamin (5-HT). Erst Anfang der 50er Jahre wurden Enteramin und Serotonin als identisch erkannt.

Die anfängliche Vermutung, 5-HT habe nur periphere Bedeutung durch sein Vorkommen in Darm und Blut, erwies sich bald als Irrtum: in unterschiedlicher Konzentration wurde 5-HT auch im Gehirn gefunden: mittels weiterentwickelter histochemischer und autoradiographischer Techniken gelangen zunehmend genauere Gehaltsbestimmungen im zentralen Nervensystem (ZNS) (Amin et al., 1954; Dahlström und Fuxe, 1964). Parallel stieg das wissenschaftliche Interesse für 5-HT als motorisch aktivierende, das Verhalten und das innere Milieu regulierende Substanz rapide an.

1.3.2 Serotoninsynthese und –metabolismus

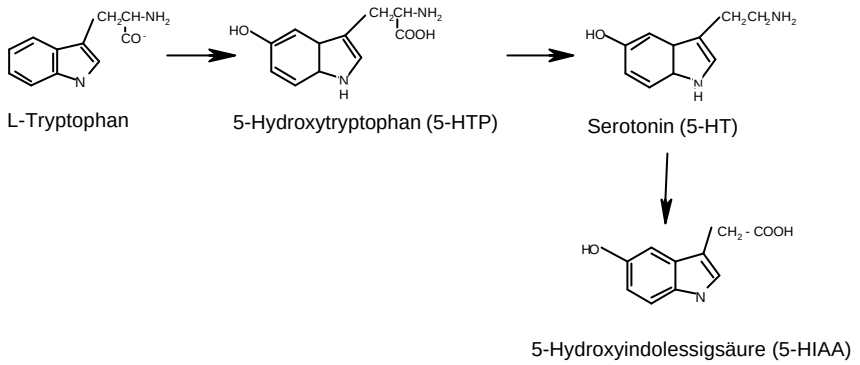

Abbildung 1: Reaktionsmechanismus der Synthese und des Metabolismus von 5-HT

Serotonin wird aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan gebildet. Tryptophan wird bevorzugt von serotonergen Neuronen aufgenommen. Die Aufnahme erfolgt über ein Carriersystem und durch Diffusion durch die Blut-Liquor-Schranke. Der erste Syntheseschritt besteht in der Hydroxylierung durch Tryptophanhydroxylase, es entsteht L-5-Hydroxytryptophan (5-HTP). Im folgenden Schritt wird 5-HTP durch Dopadecarboxylase zu 5-Hydroxytryptamin (5-HT) decarboxyliert.

Der Hauptanteil des gebildeten 5-HT wird in synaptische Vesikel aufgenommen, ein kleiner Teil verbleibt im Syntheseort, dem Cytoplasma. Die 5-HT-Freisetzung erfolgt bei neuronaler Entladung als kalziumabhängige Exocytose und Exocytose-unabhängig (Grahame, 1971). Das freigesetzte 5-HT wird durch Monoaminoxidase A (MAO-A) zu 5-HIAA abgebaut. Nicht metabolisiertes freigesetztes 5-HT (bis zu 90 %) wird über ein Na^+/K^+-ATPase-abhängiges Transporterprotein ins Zytoplasma der Neurone wiederaufgenommen. 5-HT wird nun entweder im Zytoplasma gespeichert, in die Vesikel transportiert oder durch Monoaminoxidase B (MAO-B) zu Acetat und weiter durch die Alkoholdehydrogenase zu 5-Hydroxyindol-Essigsäure (5-HIAA) und 5-Hydroxytryptophol abgebaut. Im Corpus pineale wird 5-HT zu Methoxytryptamin und weiter zu N-Acetyl-5-methoxytryptamin (Melatonin) metabolisiert.

1.3.3 Serotonerge Neuronen und ihre Lokalisation

Die Ursprungskerne serotonerger Neurone werden von neun Zellclustern gebildet. Die wichtigsten Kerngebiete befinden sich in der Raphe, weitere sind in der Pons und im oberen Hirnstamm lokalisiert. Von den rostralen Gruppen Raphe dorsalis, Raphe medianus und Nucleus interpeduncularis gehen extensive Innervationen des Telencephalon und Diencephalon aus (Dahlstrom und Fuxe, 1964). Diese Projektionen innervieren häufig überlappende Terminalfelder. Von der dorsalen Raphe führen Projektionen zum Neostriatum, zum Cortex und zum Thalamus, die mediane Raphe hingegen innerviert das limbische System.

Die kaudalen Kerngruppen der Raphe projizieren überwiegend ins Rückenmark. Interessant ist, dass es reziproke Verbindungen zwischen Zentren des Vorderhirns und der Raphe gibt, die möglicherweise vorverarbeitete Informationen über die Außenwelt der Raphe zugänglich machen (in Baumgarten und Grozdanovic, 1995). Serotonerge Zellkörper wurden im Großhirn selbst nicht gefunden. Die größte Dichte serotonerger Neurone wurde im Hypothalamus, Mittelhirn und der Area postrema nachgewiesen (Amin et al., 1954).

Unter Gliederungspunkt 1.4 werden die neuronalen Gebiete, die für die Regulation der Nahrungsaufnahme relevant sind, genau dargestellt. Auf eine ausführliche Charakterisierung sämtlicher serotonerger Innervationsgebiete soll in Baumgarten und Gröthert (1997) verwiesen werden.

1.3.4 Funktionelle Bedeutung von Serotonin

Der Transmitter Serotonin ist wesentlich an komplexen zentralen Regulationen für unterschiedliche Verhaltensmuster und an der Aufrechterhaltung der physiologisch-biochemischen Körperfunktionen beteiligt. Über periphere und zentrale Interaktionen mit anderen Transmittersystemen und auch direkt greift das serotonerge System in lebenswichtige Funktionsprozesse ein. Verbindungen bestehen zum dopaminergen und noradrenergen System, aber auch zu den Hypophysenhormonen.

Physiologisch werden Sexual- und Schlafverhalten sowie kognitive und psychische Funktionen von 5-HT beeinflusst.

Die ersten Hinweise für die große Bedeutung von 5-HT in der Regulation von Nahrungsaufnahme wurden in den 60er- und 70er-Jahren durch Experimente mit 5-HT-Vorstufen und 5-HT-Agonisten an Ratten gefunden (Blundell und Lesem,

1975; Samanin et al., 1977). Aus diesen und den folgenden Erkenntnissen aus Läsionen von 5-HT-Neuronen und 5-HT-Rezeptorblockaden wurde die Theorie von 5-HT als „Sättigungsfaktor“ erstellt. In Verhaltensversuchen konnte dargestellt werden, dass erhöhte 5-HT-Freisetzung spezifisch hemmend auf die Nahrungsmenge und die Essfrequenz wirkte. Damit bestätigte sich, dass 5-HT auf die Beendigung der Futteraufnahme Einfluss nimmt und damit mehr auf „Sättigung“ als auf „Appetit“ wirkt (in Simansky, 1998).

Durch spezifische Experimente an 5-HT-Subrezeptoren in den letzen 10 Jahren konnte unterschieden werden, welche Rezeptoren auf welche Fressparameter einwirkten (in Simansky, 1998).

Die genaue Kenntnis der Rezeptortypen, ihrer Transduktionsprozesse, Lokalisation und Funktion ist für die Entwicklung einer selektiven und nebenwirkungsarmen pharmakologischen Therapie der Essstörungen notwendig.

1.3.5 Rezeptorcharakterisierung

Eine frühe Einteilung in „M“ (durch Morphin inhibiert)- und „D“ (Dibenzylin antagonisierbar)-Rezeptor wurde verworfen.

In Rezeptorbindungsstudien wurde eine Rezeptorgruppe mit [^{3}H]5-HT-Bindung gefunden und als 5-HT_1-Rezeptoren bezeichnet. Eine weitere Gruppe wurde durch [^{3}H]Spiperon markiert und 5-HT_2-Rezeptoren genannt. Eine dritte Markierung erfolgte durch [^{3}H]LSD, welches die gleiche Affinität zu erstgenannten Rezeptoren zeigte. Innerhalb der 5-HT_1-Rezeptoren wurde weiter differenziert: Der 5-HT_{1A}-Rezeptor zeigte hohe Affinität für Spiperon, der 5-HT_{1B}-Rezeptor aber niedrige Rezeptoraffinität.

Durch molekularbiologische Methoden wurde diese pharmakologische Klassifikation bestätigt und erweitert.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt erfolgt die Einteilung durch das „Serotonin Receptor Nomenclature Committee of the International Union of Pharmacology“ (NC-IUPHAR) anhand der Hauptkriterien: molekulare Struktur, Liganden-Bindungsaffinität und intrazelluläre Transduktionsmechanismen. Hierbei ließen sich 7 Rezeptor-Hauptklassen und mehrfache Rezeptorsubtypen unterscheiden (Hoyer und Martin, 1997; Hoyer et al., 1994).

Das Nahrungsverhalten wird über mehrere 5-HT-Rezeptorsubtypen reguliert (in de

Vry und Schreiber, 2000). Eine besondere Bedeutung kommt dabei dem 5-HT_{1A}-Rezeptor zu, der im Anschluss an die kurze Beschreibung der anderen beteiligten Rezeptorsubtypen im Folgenden genauer charakterisiert wird.

1.3.5.1 Der 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2B} -Rezeptor

Die Rezeptorgruppe der 5-HT_2-Rezeptoren zeigt eine große Homologie bezüglich ihrer molekularen Struktur, ihrer Pharmakologie und ihres Signal-Transduktionssystems. Alle drei 5-HT_2-Rezeptorsubtypen sind positiv mit dem Signalsystem Phospholipase C - Inositoltriphosphat - DAG gekoppelt und mobilisieren intrazelluläres Calcium (in Barnes und Sharp, 1999). Eine funktionelle Beteiligung an der Regulation von Nahrungsaufnahme wurde den 5-HT_2-Rezeptorsubtypen zugeschrieben

Für den 5-HT_{2A}-Rezeptor konnte eine inhibitorische Rolle in Bezug auf die Kontinuität des Fressvorgangs gezeigt werden (Cooper, 1992; Neill und Cooper, 1989). Außerdem zeigte sich nach Stress-induzierten Veränderungen im Fress-Rhythmus bei Ratten eine verminderte Stimulierbarkeit des 5-HT_{2A}-Rezeptors (Chaouloff, 1994).

Gegenwärtig wird eine Involvierung polymorpher Varianten des 5-HT_{2A}-Rezeptors in die Pathogenese schizoaffektiver Psychosen diskutiert. Nachgewiesen ist die hohe Affinität von atypischen Neuroleptika für den 5-HT_{2A}-Rezeptor (in Barnes und Sharp, 1999). Interaktionen nach Rezeptorstimulation bestehen zu anderen Neurotransmittern und dem neuroendokrinen System, was sich z.B. in der Regulation des vasalen Tonus und damit des arteriellen Blutdrucks ausdrückt (Hoyer et al., 1994).

Stimulation des 5-HT_{2B}-Rezeptors führt u.a. zu verstärkten Magenkontraktionen (Baxter et al., 1995), zu Hyperphagie und Anxiolyse (Kennett et al., 1997b).

1.3.5.2 Der 5-HT_{2C} -Rezeptor

Der 5-HT_{2C}-Rezeptor kommt im Gegensatz zu den oben genannten 5-HT_2-Rezeptorsubtypen kaum außerhalb des ZNS vor. Neben dem hohen Vorkommen im Plexus choroideus werden 5-HT_{2C}-Rezeptoren u.a. in Gebieten des Cortex, im limbischen System, in den Stammganglien und im Rückenmark exprimiert.

Stimulation des 5-HT_{2C}-Rezeptors reduziert die Frequenz der Mahlzeiten und

hemmt die Lokomotion (Simansky, 1998). Daneben vermutet man einen über den 5-HT_{2C}-Rezeptor vermittelten Einfluss auf Affektivität. Knockout-Mäuse für diesen Rezeptor zeigten gesteigerte Nahrungsaufnahme und entwickelten Fettsucht. Veränderungen im Fressverhalten dieser Mäuse konnten allerdings nur bei jungen, nicht mehr bei ausgewachsenen Tieren beobachtet werden (Kennett et al., 1997a).

1.3.5.3 Der 5-HT_1-Rezeptor

Die 5-HT_1-Rezeptor-Subtypen weisen eine hohe Homologie in ihrer Aminosäuresequenz auf und sind über G-Proteine negativ mit Adenylatcyclase (AC) gekoppelt (Hoyer et al., 1994; in Barnes und Sharp, 1999).

1.3.5.3.1 Der 5-HT_{1B} -Rezeptor

Die höchste Rezeptordichte für den 5-HT_{1B}-Rezeptor bei Ratten wurde in den Basalganglien, dem Striatum und dem frontalen Cortex gefunden (Kennett, 1997b). Das Vorkommen von 5-HT_{1B}-Autorezeptoren in der Raphe wurde beschrieben (Davidson und Stamford, 1995). Außerhalb der Raphe wirken sie als Heterorezeptoren an Neuronenendigungen stimulierend auf die Ausschüttung von Neurotransmittern, wie Glutamat, Acetylcholin und Dopamin (Galloway et al., 1993).

Vormals bei Nicht-Nagetieren und beim Menschen als 5-HT_{1D}-Rezeptor beschrieben, besteht nach derzeitigem Wissen durch molekulargenetische Studien die Auffassung, dass dieser Rezeptor eine Variante des 5-HT_{1B}-Rezeptors in anderen Spezies darstellt (in Barnes und Sharp, 1999). Beim Menschen liegen die kodierenden Gene für den 5-HT_{1D}-Rezeptor und den 5-HT_{1B}-Rezeptor auf verschiedenen Chromosomen, so dass der Name 5-HT_{1D}-Rezeptor beibehalten wurde.

Stimulation des 5-HT_{1B}-Rezeptors löste bei Versuchen mit Mäusen Hyperlokomotion und Hypophagie aus. Nach Gabe des neu entwickelten selektiven 5-HT_{1B}-Rezeptoragonisten CP-94253 zeigte sich bei Ratten ebenfalls eine starke Hemmung der Futteraufnahme, jedoch keine sonstigen Verhaltensänderungen (Blundell und Halford, 1998). Die hypophage Wirkung von *d*-Fenfluramin wird von letztgenannten Autoren nicht mehr nur durch spezifische Wirkung auf den 5-HT_{1B}-Rezeptor erklärt, sondern auch durch Wirkung auf den 5-

HT_{2C}-Rezeptor.

Agonisten am 5-HT_{1B}-Rezeptor verstärken die sättigende Wirkung von freigesetztem 5-HT, damit ist ein funktioneller Zusammenhang zwischen Stimulation des 5-HT_{1B}-Rezeptors und einer Erhöhung der Sättigungsparameter anzunehmen (Simansky, 1998; Lee und Simansky, 1997).

1.3.5.3.2 Der 5-HT_{1A}-Rezeptor

Die Identifizierung des selektiven 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten 8-Hydroxy-2(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) durch Hjorth et al. (1982) war einer der wesentlichen Gründe dafür, dass der 5-HT_{1A}-Rezeptor zu den best charakterisierten serotonergen Rezeptoren gehört.

Die Sequenz des Gens für den 5-HT_{1A}-Rezeptor war die erste, die vollständig entschlüsselt werden konnte. Beim Menschen ist das Gen auf Chromosom 5 lokalisiert, die Homologie zur Ratte beträgt 89 %.

Die Rezeptordichte ist im gesamten ZNS groß, besonders jedoch in Gebieten des limbischen Systems darunter Hippocampus, Septum und Amygdala sowie in den mesencephalen Raphe-Kernen (sowohl dorsale als auch mediane). Immunozytochemisch wurde Reaktivität für den 5-HT_{1A}-Rezeptor auch in hypothalamischen und thalamischen Kernen nachgewiesen.

5-HT_{1A}-Rezeptoren kommen sowohl präsynaptisch als auch postsynaptisch vor (siehe Abb. 2). Die präsynaptischen somatodendritischen Rezeptoren sind in den Raphe-Kernen lokalisiert. Postsynaptische Rezeptoren finden sich im limbischen System und in einigen Cortexschichten. Ob 5-HT_{1A}-Rezeptoren auch in Gliazellen des Gehirns vorliegen ist gegenwärtig noch nicht gesichert. Azmitia und Whitaker-Azmitia (1995) zeigten, dass der 5-HT_{1A}-Rezeptor die Sekretion eines Wachstumsfaktors in primären Astrozytenkulturen und neuronalen Kulturen fördert. Diese Erkenntnisse führen zur Frage, ob der 5-HT_{1A}-Rezeptor eine neurotrophische Rolle in der Entwicklung des Gehirns einnehmen kann.

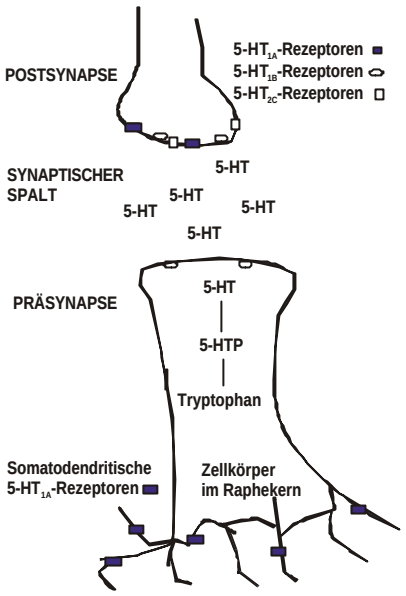

Abbildung 2: Schematische Darstellung eines serotonergen Neurons mit Lokalisation der 5-HT_{1A}-Rezeptoren (nach Blundell und Halford, 1998)

In ihrer Funktion als somatodendritische Autorezeptoren vermindern die 5-HT_{1A}-Rezeptoren die neuronale Entladungsrate und hemmen somit durch Membran-Hyperpolarisation die 5-HT-Ausschüttung. Diese Hemmung der neuronalen Aktivität ist ausschließlich bei den Agonisten 8-OH-DPAT, Buspiron, Ipsapiron und in neueren Studien bei BAY x 3702 zu finden. Nachgewiesen wurde ein Angriffspunkt an den somatodendritischen Autorezeptoren in der Raphe, wobei oben genannte Substanzen hier wahrscheinlich als volle Agonisten wirken - im Gegensatz zu den Rezeptoren im Hippocampus, wo sie nur partielle Agonisten sind. Eine stark reduzierte 5-HT-Ausschüttung nach systemischer Gabe von BAY x 3702 konnte auch im medialen präfrontalen Cortex (Casanovas et al., 2000) und in anderen Projektionsgebieten gezeigt werden (Rex, 1995).

Durch Substanzen, die am 5-HT_1-Rezeptor angreifen, wurde die funktionelle Bedeutung des 5-HT_{1A}-Rezeptors das Ernährungs-, Sexual-, und Angstverhalten, sowie für die Regulation der Temperaturhomöostase erkannt. Lokale Injektionen des Agonisten 8-OH-DPAT in die Raphe-Kerne stimulierten Nahrungs- und Sexualverhalten sowie die Lokomotion (in Fletcher et al., 1995). Des weiteren fanden diese Autoren eine erhöhte Sensibilität für Belohnungsreize nach Applikation von 8-OH-DPAT in den medianen Raphe-Kern.

Die systemische (Dourish et al., 1985; Hutson et al., 1986, 1988; Curzon, 1990) und die lokale Gabe des Agonisten in die Raphe (Bendotti und Samanin, 1986; Currie und Coscina, 1993) lösten am frei fressenden Tier Hyperphagie während der Lichtphase aus. Dies würde das Modell unterstützen, dass über die Stimulierung von somatodendritischen Rezeptoren der Raphe die Konzentration von Serotonin abfällt und dadurch eine serotonerge Hemmung der Nahrungsaufnahme aufgehoben wird. Dies führt dann zur gesteigerten Futteraufnahme. Unter veränderten Fress-Bedingungen sind die Ergebnisse allerdings abweichend.

8-OH-DPAT löst nur bei Tieren mit freiem Futterzugang den hyperhagischen Effekt aus, nicht jedoch bei nahrungskarenten (Dourish et al. 1985; Ebenezer, 1992) oder bei an festgelegte Fütterungszeiten trainierten Tieren (Aulakh et al., 1988). Die physiologischen und Verhaltenseffekte von 8-OH-DPAT werden nach Vorbehandlung mit dem 5-HT_{1A}-Rezeptorantagonisten WAY 100635 blockiert.

Klinische Bedeutung hat der 5-HT_{1A}-Rezeptor unter anderem bei Essstörungen, Angsterkrankungen, Depression und Alkoholismus (Brownell und Fairburn, 1995; Brewerton, 1995).

Tabelle 1: Funktionen, die in Verbindung mit dem 5-HT_{1A}-Rezeptor gebracht werden (+) Erhöhung, (-) Verminderung. (nach Barnes und Sharp, 1999)

Ebene	**Antwort**	**Rezeptormechanismus**
zellulär	Adenylatcyclase (-)	postsynaptisch
elektrophysiologisch	Hyperpolarisation	postsynaptisch
Verhalten	Serotoninsyndrom	postsynaptisch
	Hyperphagie	präsynaptisch
	Hypothermie	prä-/postsynaptisch
	Anxiolyse	prä-/postsynaptisch
	Sexualverhalten (+)	prä-/postsynaptisch
	Reizdiskriminierung	prä-/postsynaptisch
neurochemisch	5-HT-Freisetzung (-)	präsynaptisch
	NA-Freisetzung (+)	postsynaptisch
	Acetylcholin-Freisetzung (+)	postsynaptisch
	Glutamat-Freisetzung (-)	?
neuroendokrin	ACTH (+)	postsynaptisch
	Prolaktin (+)	postsynaptisch

Auf den in den Versuchen dieser Arbeit verwendeten Agonisten 8-OH-DPAT und den Antagonisten WAY 100635 wird gesondert im Kapitel 1.3.7 eingegangen.

1.3.6 Der 5-HT_{1A}-Rezeptoragonist 8-OH-DPAT

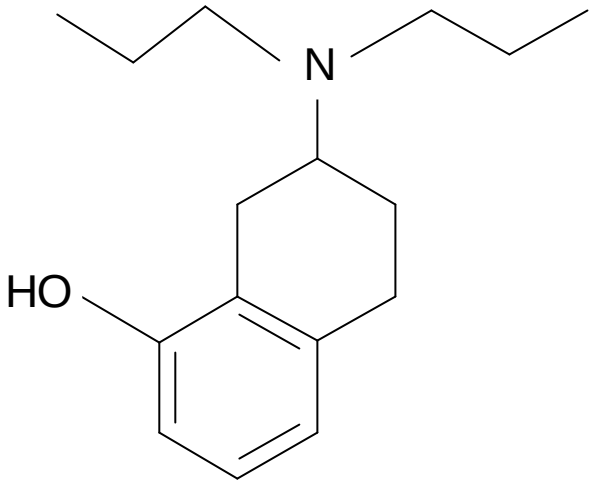

Abbildung 3: Strukturformel von 8-OH-DPAT

Im Gegensatz zu den ebenfalls hochaffinen Substanzen (+) LSD, (+) Butaclamol und Yohimbin konnte mit dem Aminotetralin 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) erstmals ein voller Agonist eingesetzt werden. Die Affinität zum 5-HT_{1A}-Rezeptor ist mit $k_i = 1^{-10}$ nM nahezu unterschiedslos in seinen optischen Isomeren sehr hoch. Chemisch scheinen die 2-n-propyl-Gruppen oder/und die Substitution an der Position 8, sowie die Ringsstruktur für die optimale Bindung und die freie Hydroxyl-Gruppe für die Aktivität entscheidend zu sein.

Elektrophysiologisch wurde 8-OH-DPAT als Agonist beschrieben. In höheren Dosen werden möglicherweise neben den präsynaptischen auch postsynaptische Rezeptoren stimuliert, was durch das Auftreten des „Serotoninsyndroms“ bekräftigt wurde. Dieses ist bei Ratten charakterisiert durch rudernde Bewegungen der vorderen Extremitäten („forepaw trading“), hyperlokomotorisches Kopfschütteln („head-weaving“) und dem Boden anliegende Körperposition („hind limb abduction“, „straub tail“) (Grahame, 1971; Jacobs, 1976; Curzon, 1999).

Die intrinsische Aktivität von 8-OH-DPAT ist am präsynaptischen Angriffsort höher als an postsynaptischen Rezeptoren (Yocca et al., 1992). Insofern hängt die agonistische Aktivität von der Rezeptorverteilung im stimulierten Hirngebiet ab.

1.3.7 Der 5-HT_{1A}-Rezeptorantagonist WAY 100635

Nach der Entwicklung verschiedener Agonisten bestand lange Zeit die Schwierigkeit, einen potenten und selektiven Antagonisten zu finden. Die verwendeten Substanzen erwiesen sich als partiell agonistisch oder nicht selektiv für den Rezeptorsubtyp.

N-tert-butyl-3,4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl-2-phenylpropanamid (WAY 100135) wurde erstmalig als selektiver und hochaffiner Antagonist entwickelt. In zweiter Generation entstand das am Chiralitätszentrum veränderte N-2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl-N-(2-pyridinyl)cyclohexan carboxamid trihydrochlorid, erhältlich unter der Bezeichnung WAY 100635. Die antagonistischen Eigenschaften konnten in Verhaltens- und Mikrodialyseversuchen bestätigt werden (Fletcher et al., 1996; Routledge et al., 1993). In Bindungsstudien am Hippocampus der Ratte zeigte sich eine größere Anzahl von Bindungsstellen für WAY 100635 als für 8-OH-DPAT. Angriffsort sind höchstwahrscheinlich in gleicher Weise postsynaptische als auch somatodendritische Rezeptoren.

1.4 Neuroanatomischer Überblick der am Fressverhalten beteiligten Hirngebiete

Die hypothalamische Region ist rostro-medial des Thalamus, zwischen den Wänden der Seitenventrikel und bodenbildend zum III. Ventrikel lokalisiert. Sie ist damit Teil des Zwischenhirns (Diencephalon). Durch seine endokrinen und vegetativen Funktionen nimmt der Hypothalamus eine bedeutende Rolle als Integrationsorgan für emotionale und affektive Verhaltensweisen ein. Er erhält vor allem Afferenzen aus Großhirnregionen des limbischen Systems wie Hippocampus und Corpus amygdala, außerdem aus dem medianen Lemniskus, aus Thalamus und Striatum, Mittel- und Rautenhirn und dem Hinterhorn des Rückenmarks. Weitere Afferenzen zum Hypothalamus entspringen aus der phylogenetisch ältesten Hirnstruktur, dem Bulbus olfactorius (Riechsystem) und den Geschmacksfasern, die beide eng mit der Nahrungsaufnahme verbunden sind.

Aszendierende Efferenzen führen zu Cortexregionen, limbischem System und Thalamus; deszendierende efferente Fasern verbinden den Hypothalamus mit der

Formatio reticularis (Mittelhirn) und vorwiegend viszeromotorischen Hirnnervenkernen. Über zahlreiche intrahypothalamische Projektionen sind die Kerne untereinander verschaltet.

Anatomisch werden die hypothalamischen Kerngebiete unterteilt in präoptische Region, lateraler Hypothalamus (LHA), (ventro-)medialer Hypothalamus (VMH), supraoptische Region, tuberale und mammilläre Region. Die hypophysären Kerne innerhalb des Hypothalamus sind in den hormonellen Regelkreis der Hypothalamus-Hypophysen-Achse eingebettet. Dabei werden Releasinghormone für die Ausschüttung von Thyreotropinen, Adrenocorticotropinen, Gonadotropinen und Somatostatinen von den hypothalamischen Hormonen Oxytocin und Vasopressin (antidiuretisches Hormon) unterschieden.

Die serotonergen Projektionen haben ihren Ursprung größtenteils in den sogenannten Raphe-Kernen paramedian des unteren Hirnstamms. Hauptursprungsgebiete sind dabei der dorsale und mediane Raphe-Kern, deren Projektionen über den medialen Vorderhirnstrang zum lateralen Hypothalamus gelangen, wo sie ihre Endigungen in der präoptischen Region, dem Nucleus suprachiasmaticus und den Mammillarkörpern haben (Fuxe, 1965). Über die Stria terminalis bestehen reziproke Verbindungen zwischen Hypothalamus und Corpus amygdala. Ein Teil der serotonergen Neurone wird auch dem Hypothalamus selbst zugesprochen, da nach Läsionen der Raphe-Kerne noch 30-40 % der normalen 5-HT-Konzentration gemessen wurden. Diese serotonergen Strukturen kommen als dendrodendritische, dendrosomatische und axodendritische Neuronverbindungen vor (Chazal und Ralston, 1987), und unterliegen der inhibitorischen Kontrolle durch die 5-HT_{1A}-Autorezeptoren (Baumgarten und Grozdanovic, 1995).

Aus den zahlreichen neuronalen und hormonellen Verbindungen geht die dem Hypothalamus zugesprochene Schlüsselposition bei der Regulation verschiedener vegetativer Funktionen, der circadianen Rhythmik und wesentlich der Sexualität und Nahrungs- und Wasseraufnahme hervor (Meguid et al., 2000). Sowohl die lokale Gabe von 5-HT, als auch die Gabe von 5-HT-Agonisten in den medianen Hypothalamus löste hypophages Verhalten bei der Ratte aus (Hutson et al., 1988; Hernandez, 1991; De Vry und Schreiber, 2000). Umgekehrt bewirkten Läsionen im LHA Aphagie und Adipsie, was neben hormonellen vor allem serotonergen Mechanismen zugeschrieben wurde. Die klassische Einteilung in das

„Fresszentrum“ und das „Sättigungszentrum“ für den LHA und den VMH wird derzeit trotz aktueller Hinweise auf eine unterschiedliche Funktion dieser beiden hypothalamischen Regionen nicht mehr vorgenommen (in Logue, 1998). Die Motivation zur Nahrungsaufnahme wird mit multifaktoriellen Funktionsmechanismen erklärt, die über periphere und zentrale Projektionsbahnen geschaltet sind. Dabei wirken z.B. Orexine oder NPY über den LHA stimulierend auf die Nahrungsaufnahme, Leptin hingegen wirkt über den VMH vermittelt hypophagisch (Shiraishi et al., 2000).

1.5 Messmethodik: *in vivo*-Mikrodialyse

Ziel der Mikrodialyse ist die Beobachtung biochemischer Prozesse in Hirn-, Muskel- oder Fettgewebe. Die intrazerebrale Mikrodialyse ermöglichte es uns in den vorliegenden Versuchen, Aussagen über physiologische Zustände bei der Nahrungsaufnahme und dynamische Veränderungen in der lateralen hypothalamischen Region unter veränderten Motivationszuständen und nach pharmakologischer Beeinflussung zu treffen.

Da der chemische Stoffaustausch vorwiegend im Extrazellularraum stattfindet, wurde die Gewinnung und Untersuchung chemischer Substanzen in ersten Ansätzen durch Hirn-Ventrikel-Perfusion und Push-Pull-Kanülen (Gaddum, 1961) möglich. Bito et al. (1966) entwickelten die ersten „Dialysesäckchen“, die sie in Gehirnparenchym von Hunden implantierten und aus denen sie Aminosäuren bestimmen konnten. Die 1972 von Delgado entwickelte „Dialytrode“ bestand aus zwei zusammengesetzten Push-Pull-Kanülen, die in einem permeablen Säckchen endeten.

Das technische Grundprinzip beruht auf der Diffusion von Substanzen durch eine semipermeable Membran, die die Grenzfläche zwischen dem Extrazellularraum im ZNS und dem sich im Innern der Sonde befindenden artifiziellen Liquors (aCSF) bildet. Die Sonde wird schonend in das Gehirngewebe eingesetzt und permanent von künstlichem Liquor durchspült. Somit stellt sich ein stabiles Gleichgewicht an der Membran ein, entsprechend dem Konzentrationsgefälle der Stoffe, der Durchlässigkeit der Membran und des Perfusionsdrucks im Dialysesystem.

Mit Hilfe der heute verwendeten cerebralen Mikrodialysetechnik, die vor allem auf Ungerstedt (in Ungerstedt, 1991) zurückgeht, werden durch die schonende Sammlung extrazellulärer Flüssigkeit aus dem Hirngewebe Gehaltsveränderungen

von physiologischen und pharmakologischen Substanzen bestimmt. Damit ist es möglich, die Wirkung von Pharmaka auf die Freisetzung von Neurotransmittern in einem bestimmten Hirnareal über eine längere zeitliche Periode zu erfassen und dies mit Verhaltensbeobachtungen zu kombinieren.

Mit der *in vivo*-Mikrodialyse können über mehrere Tage im nahezu intakten Hirngewebe am einzelnen wachen, frei beweglichen Tier endogene Substanzen gemessen und/oder über das Sondensystem appliziert werden. Dies liefert repräsentative Proben aller extrazellulärer Substanzen, die durch die Membran diffundieren und außerhalb des Körpers getrennt und analysiert werden können. Die Analysetechnik beeinflusst daher auch weitgehend die Sensitivität der Methode.

1.6 Zielsetzung

Serotonin (5-HT) beeinflusst das Fressverhalten bei der Ratte. Eine Verbindung von niedrigem 5-HT-Gehalt mit „hungrigem Zustand“ und hohem 5-HT-Gehalt mit „sattem Zustand“ ist gesichert (in Logue, 1998).

Systemische und lokale Applikation des 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten 8-OH-DPAT bewirkt bei frei fressenden Ratten ein hyperphages Verhalten.

In Mikrodialyseversuchen war nach systemischer Gabe von 8-OH-DPAT ein Abfall der 5-HT-Ausschüttung in verschiedenen Gehirnarealen der Ratte gemessen worden (Hjorth und Sharp, 1991; Casanovas et al., 1997). Lokale 8-OH-DPAT-Injektion in Raphe-Kerngebiete löste Hyperphagie aus (Vertes und Martin, 1988). Während der Nahrungsaufnahme ist die extrazelluläre 5-HT-Konzentration im LHA erhöht (Schwartz et al., 1990a).

Ausgehend davon, dass der somatodendritische 5-HT_{1A}-Rezeptoragonist 8-OH-DPAT unterschiedlich bei Ratten mit Futter ad libitum oder mit Nahrungsrestriktion auf die Nahrungsaufnahme wirkt, untersuchten wir die 5-HT-Freisetzung nach 8-OH-DPAT im Gegensatz zu anderen Autoren in nur einer Hirnregion jedoch unter verschiedenen Motivationszuständen. Dabei stellten wir folgende Fragen:

1. Interferiert die Wirkung von 8-OH-DPAT auf die 5-HT-Freisetzung im LHA mit unterschiedlichen Fressbedingungen?
2. Führt dies zu anderen Mustern in der 5-HT-Freisetzung als bisher bekannt?

Wir unterteilten unsere Mikrodialyseversuche in zwei Versuchsreihen:

Versuchsreihe A wurde am wachen, frei beweglichen Tier durchgeführt. Dabei wurden die Veränderungen in der 5-HT-Freisetzung im LHA mit unterschiedlichen Fressbedingungen korreliert.

Mit der *in vivo*-Mikrodialysetechnik war es möglich, kontinuierlich über einen Zeitraum von 180 min Dialysat aus dem LHA zu gewinnen, ohne das Versuchstier in Beweglichkeit, Fress- und Trinkverhalten einzuschränken. Damit konnten wir die Veränderungen der 5-HT-Konzentration nach Stimulation am 5-HT_{1A}-Autorezeptor unter verschiedenen Motivationszuständen, das heißt am frei fressenden, also „satten“ Tier und am nahrungskarenten, also „hungrigen“ Tier, mit und ohne Futterangebot, untersuchen.

In Versuchsreihe B wurde die Wirkung der lokalen Stimulation und Hemmung des 5-HT_{1A}-Rezeptors mit dem selektiven Agonisten 8-OH-DPAT und dem Antagonisten WAY 100635 auf die 5-HT-Konzentration im LHA am narkotisierten Tier untersucht. Dabei wurde die Technik der lokalen Substanzgabe durch die Mikrodialysesonde angewandt.

Da es in dieser zweiten Versuchsreihe nicht um Interferenzen mit Nahrungsaufnahme und Lokomotion ging, wurden die Versuche am narkotisierten Tier durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass 8-OH-DPAT in gleicher Weise am narkotisierten Tier wirkte, wurde die Wirkung des Agonisten nach peripherer Applikation am wachen und narkotisierten Tier verglichen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tiermaterial

Für alle Versuche wurden männliche Wistar-Ratten der Versuchstieranstalt Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) verwendet. Die Unterbringung erfolgte in Makrolonkäfigen mit den Maßen 40 cm x 60 cm x 25 cm. Bis zum Zeitpunkt der Operation (OP) lebten maximal fünf Tiere in den Tierhaltungskäfigen. Ein Lichtprogramm gab einen circadianen 12-Stunden-Rhythmus mit Lichtphase von 6 bis 18 Uhr vor. Die Tiere wurden mit ad libitum Wasser versorgt, das Futter wurde in Form von Standardpellets Altromin 1326 (Altromin, Deutschland) verabreicht. Für die Versuche am nahrungskarenten Tier wurde dies 16 h ohne Futter gehalten.

Die Raumtemperatur war konstant auf 22 ± 1°C eingestellt.

Vor der Operation wogen die Tiere zwischen 250 ± 30 g. Die Adaptationsphase in der neuen Tierhaltung betrug mindestens 14 Tage. Nach der Operation wurde eine Erholungsphase von 7 Tagen eingehalten.

Postoperativ wurden die Ratten einzeln in zylindrische Käfige mit einem Durchmesser von 37 cm und einer Höhe von 40 cm gesetzt. Sie erhielten Wasser und Futter ad libitum. Nach Wiedererlangen ihrer präoperativen Körpermasse (KM) waren die Tiere versuchsbereit. Während der Mikrodialyseversuche am wachen Tier befanden sich die Ratten ebenfalls in den oben angegebenen Käfigen.

Im folgenden werden die Ratten, die während der Versuche ad libitum Futter erhielten in Anlehnung an den in der englischsprachigen Literatur gebräuchlichen Begriff „freely feeding“ als „frei fressende“ Tiere bezeichnet. Hingegen werden diejenigen Ratten, denen Futter zeitweise vor oder während der Versuche entzogen wurde als „nahrungskarent“ (im Englischen „food deprived“) bezeichnet.

2.2 Verwendete Substanzen

Tabelle 2: Herstellernachweis der verwendeten Substanzen

Substanz	Hersteller
8-OH-DPAT (= 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin)	RBI (USA)
WAY 100635 (= N-tert-butyl-3,4-(2-methoxyphenyl) piperazin-1-yl-2-phenylpropanamid)	RBI (USA)
aCSF	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Chloralhydrat	Berlin Chemie (Deutschland)
Pentobarbital	Berlin Chemie (Deutschland)
Perchlorsäure	Berlin Chemie (Deutschland)

Die Substanzen wurden in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Die Kontrolltiere wurden unter gleichen Versuchsbedingungen mit reiner Kochsalzlösung behandelt.

Alle Dosisberechnungen beziehen sich auf die Körpermasse der Tiere (mg/kg oder µg/kg).

In Versuchsreihe A (Versuchsanordnung siehe Tabelle 5) wurde intraperitoneal (i.p.) appliziert. 8-OH-DPAT wurde in zwei Dosen gegeben: 100 µg/kg KM und 300 µg/kg KM. Das Applikationsvolumen betrug 1 ml/kg KM.

In Versuchsreihe B wurde über das Sondensystem lokal appliziert. Die Substanzen wurden in artifizieller cerebrospinaler Flüssigkeit (aCSF) gelöst und lagen in 2 x 10^{-6} M Konzentration vor. Das Molekulargewicht von 8-OH-DPAT

beträgt 328,29 g/mol, das Molekulargewicht von WAY 100635 beträgt 538,65 g/mol Über das Mikrospritzensystem wurde über die Dauer von 20 min appliziert.

2.3 Futteraufnahme ohne Mikrodialyse

Alle Versuche wurden in der Hellphase durchgeführt. Um eine wirksame Dosierung für die Mikrodialyseversuche festlegen zu können, wurden folgende Experimente durchgeführt:

Die wie oben beschrieben gehaltenen Tiere erhielten über einen Zeitraum von 2 h Futter ad libitum. Nach der ersten und nach der zweiten Stunde wurde jeweils der Futterverbrauch mittels Abwägen der Pellets in Gramm gemessen. Zwanzig Minuten vor Futtergabe wurde 8-OH-DPAT i.p. appliziert. Hierbei wurden zwei Versuchsreihen mit den Substanzdosierungen 100 µg/kg KM und 300 µg/kg KM durchgeführt. Die Kontrollgruppe erhielt statt der Substanzgabe das gleiche Applikationsvolumen NaCl.

2.4 Lokomotion

Zur Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit der unterschiedlichen Substanzeffekte beim frei fressenden und nahrungskarenten Tier von der lokomotorischen Aktivität wurden folgende Versuche durchgeführt:

Die Tiere wurden unter den o.g. Standardbedingungen gehalten. Eine Hälfte der Gruppe war 16 h nahrungskarent, die andere Hälfte hatte freien Futterzugang bis zum Beginn des Versuchs. Beide Gruppen wurden mit 300 µg/kg 8-OH-DPAT behandelt. Die Tierkäfige wurden auf ein Animex (LKB, Schweden) platziert. Die Aktivitätsmessung erfolgte durch ein Zählsystem, das die Unterbrechungen auf dem vertikalen elektromagnetischen Feld, das von dem Animex aufgebaut wird, als Impulse aufnimmt. Im Intervall von 20 min wurden die individuellen Lokomotionswerte über eine Zeit von 1h vor Applikation bis 2 h nach Applikation abgelesen.

2.5 Versuche mit Mikrodialysetechnik

2.5.1 Operative Vorbereitungen

2.5.1.1 Operation für Mikrodialyse am wachen Tier

Für die Mikrodialyseversuche am wachen Tier musste eine Führungskanüle (CMA, Schweden) für die Mikrodialysesonde implantiert werden. Dazu wurde das Tier mit Pentobarbital in einer Dosis von 45 mg/kg KM (i.p.) narkotisiert. Das Tier wurde in ein stereotaktisches Gerät eingespannt, danach wurde mit einem Skalpell die Haut im Längsschnitt bis zum Periost aufgeschnitten und der Knochen

freipräpariert. Die Führungskanüle wurde in das dafür gebohrte intracraniale Loch eingeführt. Drei weitere Bohrungen dienten dem Einsetzen von Schrauben, die zusammen mit der eingeführten Kanüle den abschließend aufgebauten Sockel aus Kunststoff (Technovit, Kulzer, Deutschland) zur Fixierung bildeten. Am Ende wurde der Schnitt mit chirurgischem Nahtmaterial verschlossen. Bis zum Ende der Narkose blieb die Ratte auf einer Wärmeplatte und kam dann in die Tierhaltung zurück.

Die Koordinaten für die Lokalisation der Führungskanüle in den Kerngebieten des lateralen Hypothalamus betrugen nach Paxinos und Watson (1986) 2,5 mm posterior des Bregmas, 1,6 mm lateral der Sagittalnaht und 5,5 mm intracranial. Die Sonde reichte 3 mm über die Führungskanüle hinaus, womit eine intracraniale Gesamttiefe von 8,5 mm erreicht wurde (Abb. 4).

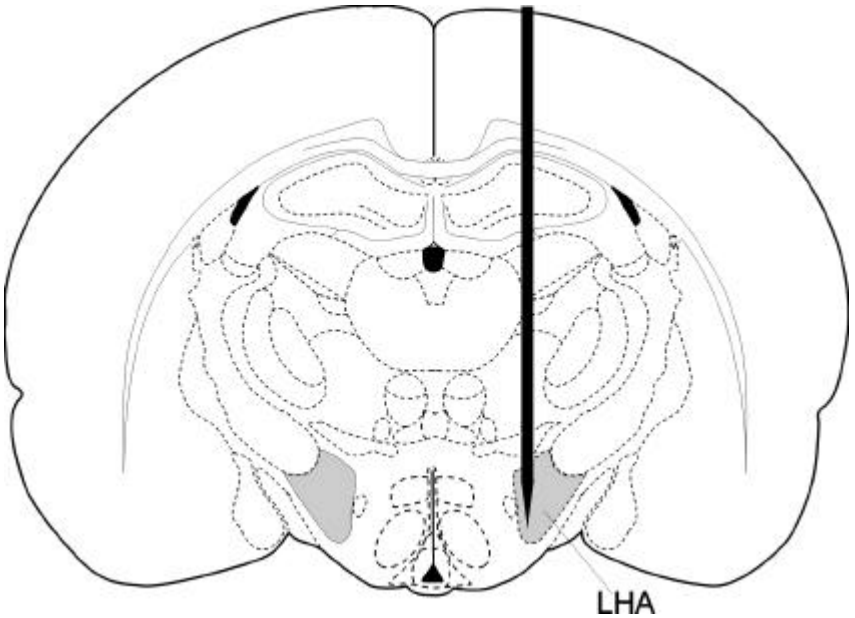

Abbildung 4: Lokalisation der Mikrodialysesonde im lateralen Hypothalamus

2.5.1.2 Operation für Mikrodialyse am narkotisierten Tier

Mit einer Dosis von 400 mg/kg KM Chloralhydrat wurde die Ratte durch i.p. Injektion in Narkose versetzt. Wie unter 2.5.1.1 beschrieben, erfolgte die Präparation bis zum Knochen. Das Loch für die Sonde wurde mit einem Elektrobohrer entsprechend der Koordinaten gewählt. Da in der Versuchsanordnung für narkotisierte Tiere die Führungskanüle nicht notwendig

war, errechnete sich die Sondentiefe mit 8,5 mm von der Gehirnoberfläche aus, die posterioren und lateralen Werte konnten beibehalten werden. Die Sonde wurde direkt in die gebohrte Öffnung eingeführt und das Tier auf dem stereotaktischen OP-Tisch bis Versuchende in Narkose belassen.

2.5.2 Messtechnik

2.5.2.1 Dialysematerial

Die an den verwendeten Sonden fixierten Dialysemembrane (CMA 10, CMA, Schweden) waren 3 mm (Versuchsreihe A: wache Ratte) und 2 mm (Versuchsreihe B: narkotisierte Ratte) lang und wiesen einen Durchmesser von 0,5 mm auf (Abb. 5). Die Moleküldurchlässigkeit („cut-off“) belief sich auf maximal 20 000 Dalton.

Die relative Wiederfindungsrate (%) wurde in Vorversuchen bestimmt (Werte siehe unter 3.1.1).

Aufbau einer Mikrodialysesonde

Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Mikrodialysesonde

Die Sonde wurde an ein Schlauchsystem aus Teflon angeschlossen.

Mittels einer CMA Mikroinjektionspumpe wurde das gesamte System mit im Ultraschallbad entgaster aCSF kontinuierlich mit einer Flussrate von 1 µl/min durchspült.

Die Zusammensetzung der aCSF bestand aus 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 27 mM $NaHCO_3$, 0,5 mM $NaH_2PO_4H_2O$, 2,4 mM Na_2HPO_4 2 H_2O, 0,5 mM Na_2SO_4, 1 mM $MgCl_2$ 6 H_2O und 1 mM $CaCl_2$ 2 H_2O. Der pH wurde mit H_3PO_4 30 % auf 7,4 eingestellt.

Bei einer konstanten Flussrate von 1 µl/min konnte im Intervall von 20 min ein Dialysatvolumen von 20 µl entnommen werden. Als Oxidationsschutz wurden in das Eppendorfgefäß, in dem das Dialysat aufgefangen wurde, vor jedem neuen Probenintervall 5 µl Perchlorsäure 10 % zugegeben.

2.5.2.2 Analyse der Mikrodialysate

Die Trennung von 5-HT aus dem Injektionsgemisch erfolgte durch Umkehrphasen-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography = HPLC) an einer 200 mm langen Messsäule. Diese besteht prinzipiell aus einem Rohr, das an beiden Enden mit porösen Filtern abgedichtet ist. Das Säulenbett enthält einen dichten Verband poröser Teilchen, an deren Porenwänden ein Grenzfilm gebildet wird. An diesem werden die im Fließmittel befindlichen zu analysierenden Substanzen unterschiedlich lange, charakteristisch für die jeweilige Substanz, adsorbiert und dann wieder in das Fließmittel abgegeben. Der adsorbtive Grenzfilm entspricht der stationären Phase. Das bewegte Fließmittel entspricht der mobilen Phase.

Die im Injektionsgemisch befindlichen Substanzen werden demnach je nach Verzögerung an der stationären Phase eluiert und treten mit unterschiedlicher Verweildauer in getrenntem Zustand aus der Säule aus, an welcher sie detektiert werden.

Als mobile Phase wurde eine Lösung aus dreifach destilliertem, entionisiertem Wasser, dem 0,1 mM NaH_2PO_4, 0,7 mM EDTA und 0,23 mM OSA zugesetzt wurden, verwendet. Die Lösung wurde mit konzentrierter Phosphorsäure auf einen pH von 5,22 eingestellt und gefiltert. Anschließend wurde 4 % Isopropanol zugefügt. Nachfolgend wurde die mobile Phase mit einer Heliumspülung und durch Ultraschall entgast.

Das Dialysat wurde in die HPLC durch ein Injektionsventil in die 20 µl Sammelschleife (Rheodyne, USA) eingegeben. Durch eine Pumpe mit Pulsationsdämpfer (Gynkotek, Deutschland) wurde der Fluss der mobilen Phase auf 250 µl/min konstant gehalten.

Nach der chromatographischen Trennung wurde 5-HT bei einem Gleichspannungspotential von + 0,650 V an einer Glaskarbonelektrode gegenüber einer Ag/AgCl-Referenzelektrode (Antec VT03 elektrochemische Zelle) mit Hilfe eines elektrochemischen Detektors (EC-30, Gynkotek, Deutschland) oxidiert. Der Oxidationsstrom wurde mit einem Chromatographie-Datensystem aufgezeichnet und ausgewertet.

Die Nachweisgrenze für 5-HT lag im Bereich $1x10^{-10}$ M.

Aus Proben, die einer Standardlösung in künstlichem Liquor entstammten konnte die spezifische Retentionszeit für 5-HT auf dem Chromatogramm bestimmt werden (Abb. 6). Dies diente der Identifikation von 5-HT im aufgegebenen Dialysat.

Serotonin im lateralen Hypothalamus

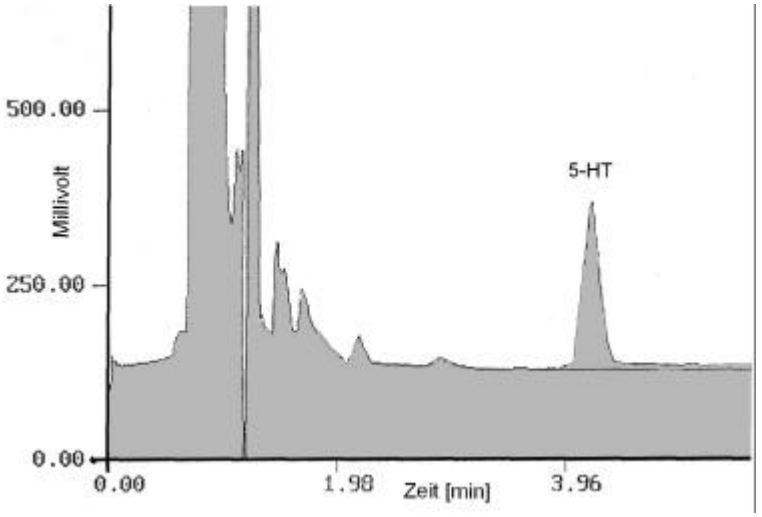

Abbildung 6: Chromatogramm eines Dialysats aus dem lateralen Hypothalamus der Ratte mit Angabe der Retentionszeit für 5-HT.

2.5.3 Versuchsaufbau

2.5.3.1 Allgemeine Vorbereitungen

Am Vortag des Experimentes um 16 Uhr wurden die Sonden gespült:

Tabelle 3: Schematische Darstellung der Sondenspülung

ungebrauchte Sonde	30 min bidest. H_20	30 min aCSF pH 7,4
einmal gebrauchte	30 min Ethanol 30 %	30 min aCSF

Sonde		pH 7,4

Die Dauer des Sondengebrauchs belief sich bei einmaligem Gebrauch auf 20 Stunden, bei zweimaligem Gebrauch auf 40 h.

Die Flüssigkeiten wurden stets im UV-Bad entgast, um Luftblasen im Schlauch- und Sondensystem zu vermeiden.

Die Qualitätsprüfung der Sonde erfolgte durch Bestimmung der Wiederfindungsrate in aCSF. Unter einer den Versuchsbedingungen entsprechenden Flussrate von 1 µl/min wurde die relative Wiederfindungsrate [%] aus einer 10^{-6} M 5-HT-Standardlösung bestimmt.

Versuchsaufbau Mikrodialyse

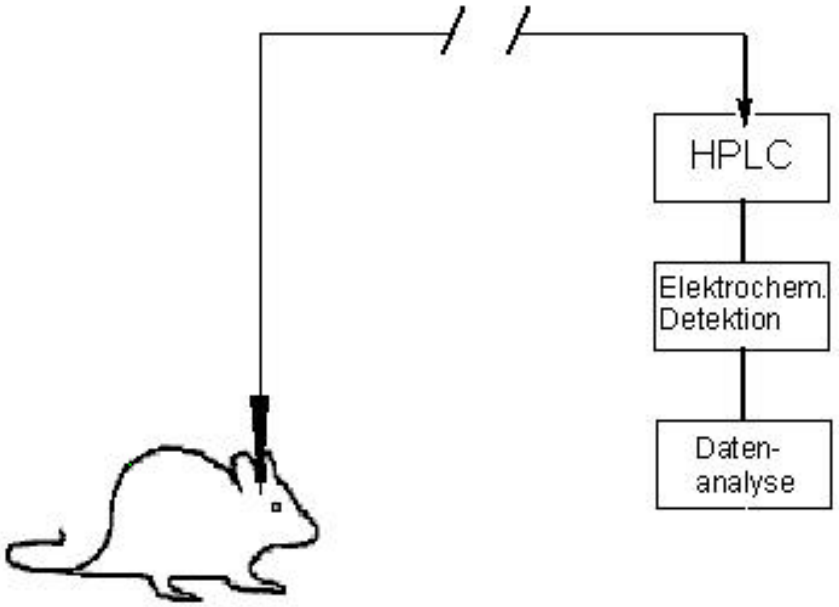

Abbildung 7: Schematische Versuchsanordnung der Mikrodialyse im LHA der Ratte. Das dialysierte Probenvolumen wurde mit Hilfe eines Injektionsventils alle 20 min in das HPLC-System eingegeben und 5-HT elektrochemisch detektiert.

Die Mikrodialyseversuche wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

A Versuche mit peripherer Substanzgabe (waches, frei bewegliches Tier)

Tabelle 4: Versuchsreihe A mit Applikationsschema bei peripherer Substanzgabe

sattes Tier (Futter ad libitum)	ohne Futterangebot nach Gabe von 100 bzw. 300 µg/kg 8-OH-DPAT bzw. NaCl (i.p.)	mit Futterangebot nach Gabe von 300 µg/kg 8-OH-DPAT (i.p.)
hungriges Tier (Nahrungskarenz)	ohne Futterangebot nach Gabe von 300 µg/kg 8-OH-DPAT bzw. NaCl (i.p.)	mit Futterangebot nach Gabe von 300 µg/kg 8-OH-DPAT (i.p.)

B Versuche mit zentraler Substanzgabe (narkotisiertes Tier)

Tabelle 5: Versuchsreihe B mit Applikationsschema bei zentraler Substanzgabe

Vorversuch: systemische Gabe von **300 µg/kg 8-OH-DPAT (i.p.)**
Lokale Gabe von **8-OH-DPAT [2 x 10^{-6} M]** über das Mikrodialysesystem in den LHA (Dauer: 20 min)
Lokale Gabe von **WAY 100635 [2 x 10^{-6} M]** über das Mikrodialysesystem in den LHA (Dauer: 20 min)
Lokale Gabe von **WAY 100635 [2 x 10^{-6} M]**, anschließend von **8-OH-DPAT [2 x 10^{-6} M]** über das Mikrodialysesystem in den LHA (Dauer jeweils: 20 min)

2.5.3.2 Mikrodialyse mit peripherer Substanzgabe

Dem wachen Tier wurde 16 h vor Versuchsbeginn die gespülte Sonde ohne Narkose in den LHA eingesetzt. Bei einer Flussrate von 1 µl/min wurden nach etwa 30 min im Abstand von 20 min Dialysate gesammelt und im Chromatogramm der Peak für 5-HT anhand der spezifischen Retentionszeit bestimmt.

Am folgenden Morgen um 8 Uhr begann der Versuch mit 20 minütigen Sammelperioden der Dialysate bei einer Flussrate von 1 µl/min. Aus drei konstanten Werten wurde die Basislinie gemittelt. Nach Erreichen der Basislinie wurde die gelöste Substanz appliziert und im Intervall von 20 min mit den Dialysat-

Sammlungen fortgefahren. Die Sammlung nach Applikation erfolgte zwei Stunden lang.

Die Versuche am wachen, frei beweglichen Tier wurden zuerst am satten Tier mit Futterentzug nach Substanzapplikation, dann am 16 h nahrungskarenten Tier entsprechend durchgeführt (Tab. 4).

In einer zweiten Versuchsreihe wurde sowohl dem satten, als auch dem hungrigen Tier nach Substanzgabe Futter angeboten und der Verbrauch stündlich gemessen (Tab. 4).

2.5.3.3 Mikrodialyse mit zentraler Substanzgabe

Alle Versuchstiere hatten vor Narkose Futter ad libitum.

Unter kontrollierter Dauernarkose mit Chloralhydrat wurde die 2 mm tiefe, nach angegebenem Schema gespülte Sonde in den Führungskanal eingeführt. Bei einer aCSF-Flußrate von 1 µl/min wurden über einen Zeitraum von 20 min 20 µl Dialysat gesammelt, dem 5 µl Perchlorsäure wie in den vorausgehend beschriebenen Versuchen am wachen Tier zugesetzt wurden. Das Gesamtvolumen von 25 µl wurde mit Hilfe eines Injektionsventils alle 20 min in das HPLC-System eingegeben. Nach Erreichen einer stabilen Basislinie wurde die jeweilige Substanz appliziert.

Hierbei wurde wiederum die periphere oder lokale Applikationsweise benutzt, sowie die unter 2.5.3.1 Punkt B angegebenen Kombinationen und Konzentrationen von 8-OH-DPAT und WAY 100635 eingesetzt. Die intraperitoneale Applikation erfolgte wie unter 2.5.3.2 beschrieben.

Mittels eines dreifachen Mikrospritzensystems unter rechnerischer Berücksichtigung des Totraumvolumens im Schlauchsystem konnten die beiden oben angegebenen Substanzen als Einzel- oder Doppelapplikation verabreicht werden. Zum Applikationszeitpunkt wurde von aCSF auf das in aCSF gelöste entsprechende Pharmakon umgeschaltet. Bei Verwendung beider Substanzen wurde nach Applikation von WAY 100635 auf das dritte System mit in aCSF gelöstem 8-OH-DPAT gewechselt.

Während des gesamten Versuchs wurden weiterhin im Intervall von 20 min Dialyseproben gesammelt und auf die HPLC aufgetragen. Versuchende war 120 min nach Gabe der letzten Substanz. Das Tier wurde in Exitus letalis durch eine Überdosis Chloralhydrat versetzt.

2.6 Histologie

Nach Abschluss der Dialyseversuche wurde dem eingeschläferten Tier die Mikrodialysesonde entnommen und das Gehirn freipräpariert und gefroren. Mit einem Mikrotom wurde das fixierte Präparat in 30 µm dünne Scheiben geschnitten. Anhand des Paxinos/Watson-Atlas wurde von einem unabhängigen Beobachter die Sondenlokalisation festgestellt. Die fehlgetroffenen Operationen wurden ausgeschlossen.

2.7 Statistik

2.7.1 Wiederfindungsrate für Mikrodialysesonden

Die Analyse erfolgte mit dem Paired t-Test.

2.7.2 Fressversuche

Die Daten sind als Mittelwerte + SEM angegeben. Die Analyse erfolgte mit der einfachen Varianzanalyse (One-Way ANOVA), gefolgt von Dunnett's Test oder bei nicht erreichter Normalitätsverteilung mit dem Kruskal-Wallis Test, gefolgt von Dunn's Test.

2.7.3 Lokomotion

Bei nicht erreichter Normalverteilung wurden die Gruppenvergleiche mit dem Mann-Whithney *U*-Test durchgeführt.

2.7.4 Mikrodialyseversuche

Da die Konzentrationen von 5-HT im Dialysat zwischen den Versuchstieren variierten, wurden die Werte prozentual angegeben. Hierbei wurde eine Basislinie aus der Sammlung dreier Dialysate vor Applikation (siehe Punkt 2.5.3.2) erstellt und als 100 % gesetzt. Die folgenden Werte wurden stets auf diese 100 % bezogen.

Vergleiche zwischen den Gruppen wurden entweder über die einfache Varianzanalyse und folgendem Dunnett's Test oder über den Student's t-Test oder bei fehlender Normalverteilung über den nicht-parametrischen Mann-Whithney *U*-Test berechnet. In Versuchsreihe B wurde neben den oben genannten Tests mit mehrfacher Varianzanalyse (ANOVA on repeated measures) gerechnet. Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ betrachtet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Methodische Versuche

3.1.1 Wiederfindungsrate der Mikrodialysesonden für 5-HT

Die Mikrodialysesonden wiesen je nach Membranlänge und nach Dauer der Verwendung geringe, aber nicht signifikante Unterschiede in der Wiederfindungsrate für 5-HT auf. Die höchste Wiederfindungsrate wurde beim erstmaligem Gebrauch über 20 h von 3 mm Sonden mit 22,2 ± 1,28 %, die niedrigsten Werte bei einer Verwendungsdauer über 40 h von 2 mm Sonden mit 13,8 ± 1,54 % gemessen (Abb. 8).

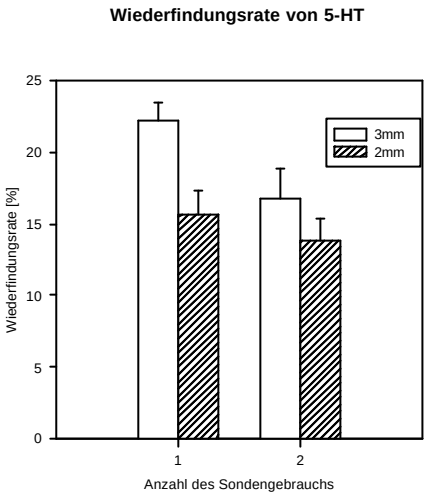

Abbildung 8: Wiederfindungsrate für 5-HT [%] von Mikrodialysesonden mit 2 mm und 3 mm Länge für 5-HT. Beim ersten Gebrauch der Sonden war die Dauer 20 h. Beim wiederholten Gebrauch 40 h. Paired t-Test (n = 6)

3.1.2 Postoperative Entwicklung der Körpermasse der Versuchstiere

Die Tiere wurden am Tag ihrer Operation um 8 Uhr gewogen und anschließend die Führungskanüle für die Mikrodialyse in den LHA implantiert. In den folgenden 6 Tagen wurde jeweils zum gleichen Zeitpunkt die KM bestimmt. Bei einer mittleren Ausgangsmasse von 252,6 g ± 4,36 g verloren die Tiere nach der Operation bis zu 6 % ihrer KM. Mit einem Anstieg von Tag 1 bis 5 erholten sich die Tiere innerhalb von 5 Tagen und erreichten bzw. überschritten ihre präoperative KM (Abb.9).

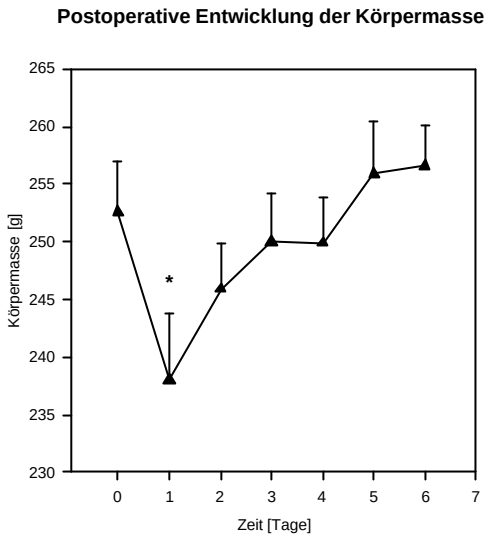

Abbildung 9: Postoperative Entwicklung der Körpermasse [g] nach Implantation der Mikrodialyseführungskanüle in den LHA. ANOVA on Repeated Measures (n = 5; Mittelwert + SEM; *p<0,05)

3.2 Futteraufnahme

3.2.1 Futter ad libitum

Die Versuchstiere hatten durchgehend freien Futterzugang. Der Futterverbrauch wurde über zwei Stunden gemessen. Die unbehandelten und die mit einer Dosis von 100 µg/kg 8-OH-DPAT behandelten Tiere zeigten eine für das Fressverhalten der Ratten in der Hellphase typische Futteraufnahme von 0,62 ± 0,17 g.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe stimulierte 8-OH-DPAT in der Dosis von 300 µg/kg signifikant die Futteraufnahme mit 1,46 ± 0,26 g (Abb. 10).

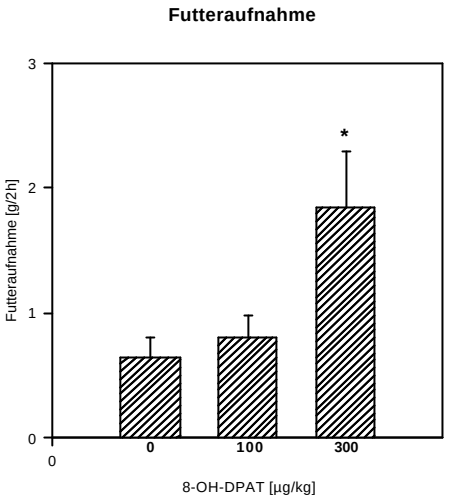

Abbildung 10: Wirkung von 8-OH-DPAT [100 µg/kg und 300 µg/kg i.p.] auf die Futteraufnahme der frei fressenden Ratte. ANOVA gefolgt von Dunnett's Test. (n = 18; Mittelwert + SEM; *p<0,05 gegenüber Kontrolle)

3.2.2 Nahrungskarenz

Im Gegensatz zum vorausgehenden Versuch bewirkte 8-OH-DPAT in der gleichen Dosierung bei Ratten, die über Nacht 16 h nahrungskarent gehalten wurden, eine signifikante Hemmung der Futteraufnahme. Die nahrungskarenten Kontrolltiere zeigten während der 2-stündigen Testmahlzeit einen Futterverbrauch von 7,70 ± 0,45 g. Dieser Verbrauch wurde durch Gabe von 300 µg/kg 8-OH-DPAT auf 4,71 ± 0,85 g signifikant reduziert (Abb. 11).

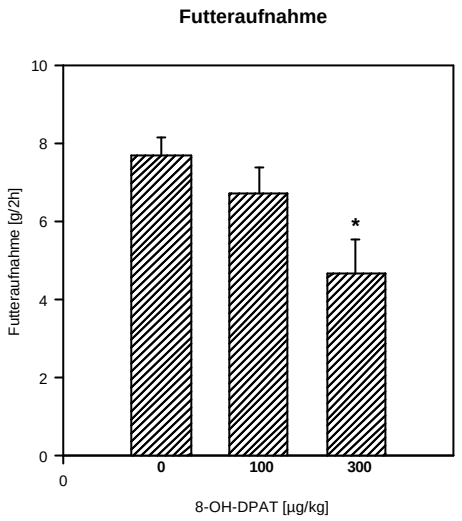

Abbildung 11: Wirkung von 8-OH-DPAT [100 µg/kg und 300 µg/kg i.p.] auf die Futteraufnahme der nahrungskarenten Ratte. ANOVA gefolgt von Dunnett's Test (n = 18; Mittelwert + SEM; *p<0,05 gegenüber Kontrolle)

3.3 Lokomotorische Aktivität

Die Lokomotionswerte wurden zwischen der frei fressenden und der nahrungskarenten Ratte verglichen. Es wurde im Intervall von 20 min gemessen, nach 60 min wurden 300 µg/kg 8-OH-DPAT i.p. appliziert.

Sechzig und 40 min vor Injektion wurden höhere Lokomotionswerte bei den nahrungskarenten Tieren gemessen, jedoch lediglich 20 min vor Injektion waren diese signifikant unterschiedlich. Hingegen zeigte sich nach Substanzgabe bei motorischen Aktivitätsparametern im Gegensatz zur Futteraufnahme zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den frei fressenden und nahrungskarenten Tieren. (Abb. 12)

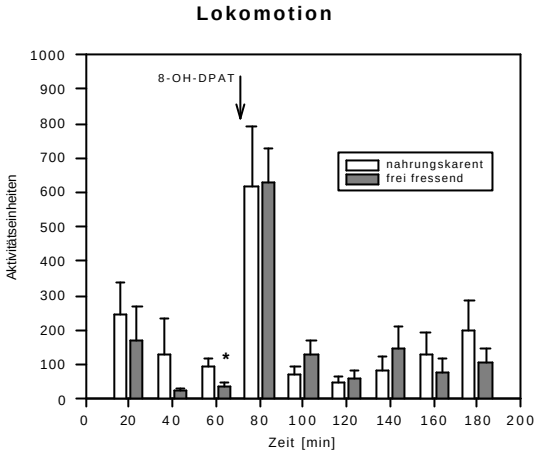

Abbildung 12: Wirkung von 8-OH-DPAT [300 µg/kg i.p.] auf die Lokomotion der frei fressenden und der nahrungskarenten Ratte gemessen durch das ANIMEX. Mann- Whitney *U*-Test (n = 5; Mittelwert + SEM. *p<0,05 gegenüber nahrungskarenter Kontrolle)

3.4 Mikrodialyseversuche mit peripherer Substanzgabe (wache Ratte)

3.4.1 Futter ad libitum

In den ersten Mikrodialyseversuchen am wachen, frei beweglichen Tier wurden 100 oder 300 µg/kg 8-OH-DPAT i.p. appliziert und die intrahypothalamische 5-HT-Freisetzung gemessen. Die Tiere hatten freien Futterzugang bis vor Substanzgabe, nach der Applikation hatte das Tier kein Futterangebot bis zum Ende des Versuchs. Im Vergleich mit den NaCl-behandelten Kontrolltieren zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vor Substanzgabe. Zwanzig Minuten nach einmaliger Gabe von 300 µg/kg 8-OH-DPAT zeigte sich ein signifikanter Abfall der hypothalamischen 5-HT-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle, der 40 und 60 min nach Substanzgabe anhielt und signifikant blieb (Abb. 13).

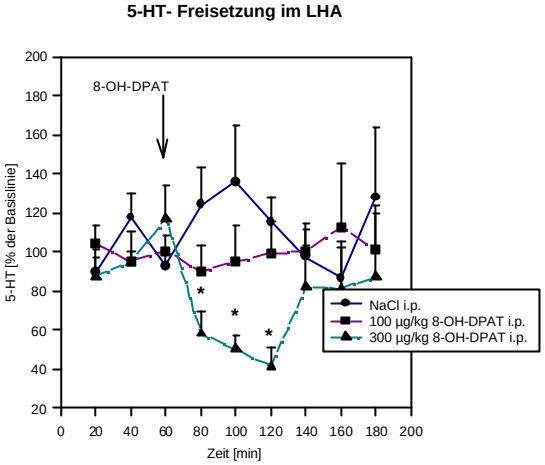

Abbildung 13: Wirkung von 8-OH-DPAT [100 µg/kg und 300 µg/kg i.p.] auf die extrazelluläre 5-HT-Freisetzung im LHA der wachen und frei fressenden Ratte. Die Werte sind als Prozentzahl der Basislinie angegeben. Der Mittelwert der ersten drei Proben ergibt 100 %. ANOVA gefolgt von Dunn's Test (n = 8; Mittelwert + SEM; *p<0,05 gegenüber NaCl-behandelter Kontrolle)

3.4.2 Nahrungskarenz

Im Gegensatz zu Abb. 13 zeigte sich kein Unterschied in der intrahypothalamischen 5-HT-Freisetzung zwischen Tieren, die mit 300 µg/kg 8-OH-DPAT oder NaCl behandelt waren, wenn die Tiere 16 h zuvor nahrungskarent waren (Abb. 14).

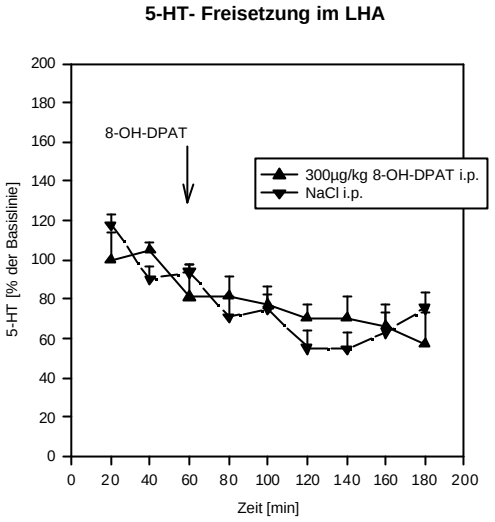

Abbildung 14: Wirkung von 8OH-DPAT [300 µg/kg i.p.] und NaCl auf die extrazelluläre 5-HT-Freisetzung im LHA der wachen, 16 h nahrungskarenten Ratte. Die Werte sind als Prozentzahl der Basislinie angegeben. Der Mittelwert der ersten drei Proben ergibt 100 %. ANOVA gefolgt von Dunn's Test (n = 7; Mittelwert + SEM)

3.4.3 Futter nach Substanzgabe bei Tieren mit Futter ad libitum

Wenn die frei fressenden Tiere auch nach Substanzgabe freien Futterzugang hatten, wirkte 8-OH-DPAT stimulierend auf die Futteraufnahme, was in den Verhaltens-Versuchen bereits beobachtet wurde. Dieser Effekt resultierte aus einer Hemmung der 5-HT-Freisetzung, verglichen mit den Bedingungen ohne Futterzugang nach Substanzgabe. Vierzig und 60 min nach Gabe von 8-OH-DPAT war die 5-HT-Freisetzung höher als bei Versuch 3.4.1 (Abb. 15). Die Tiere nahmen 2,54 ± 0,23 g Futter/2h auf.

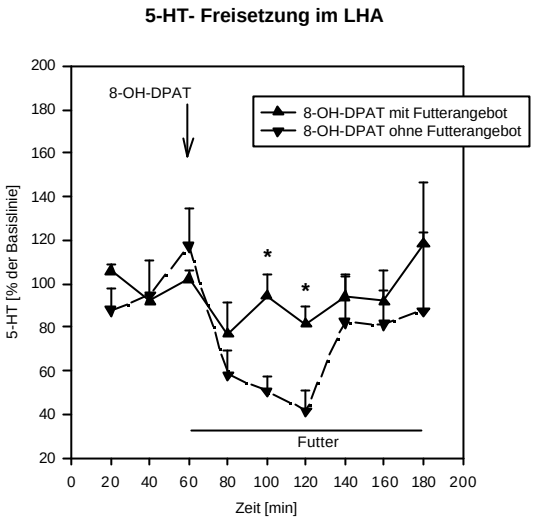

Abbildung 15: Wirkung von 8-OH-DPAT [300 µg/kg i.p.] auf die extrazelluläre 5-HT-Freisetzung im LHA der wachen, frei fressenden Ratte. Nach Substanzgabe hatten die satten Tiere weiterhin Futterangebot bis zum Ende des Versuchs im Unterschied zur Kontrollgruppe. Die Werte sind als Prozentzahl der Basislinie angegeben. Der Mittelwert der ersten drei Proben ergibt 100 %. Student's t-Test (n = 8. Mittelwert + SEM. *p<0,05 gegenüber Kontrolle ohne Futterangebot).

3.4.4 Futter nach Substanzgabe bei nahrungskarenten Tieren

Unter den Versuchsbedingungen des Futterangebots nach Substanzgabe zeigte sich am wachen, 16 h nahrungskarenten Tier ebenfalls ein Anstieg der 5-HT-Freisetzung im LHA. Zu keinem Zeitpunkt jedoch war dieser Anstieg im Vergleich zu den ebenfalls nahrungskarenten Kontrolltieren signifikant (Abb. 16). Die Tiere nahmen 3,25 ± 0,28 g Futter/2h auf. Während der ersten Stunde nahmen sie 2,80 ± 0,23 g Futter auf, unter den gleichen Versuchsbedingungen nahmen NaCl-behandelten Kontrolltiere bereits 4,68 ± 0,85 g Futter auf (Voigt et al., 1998).

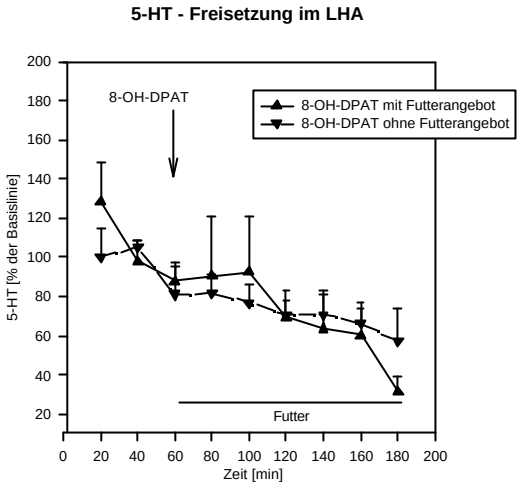

Abbildung 16: Wirkung von 8-OH-DPAT [300 µg/kg i.p.] auf die extrazelluläre 5-HT-Freisetzung im LHA der wachen, 16 h nahrungskarenten Ratte. Nach Substanzgabe wurde bis zum Ende des Versuchs Futter angeboten. Die Kontrollgruppe hatte keinen Futterzugang. Die Werte sind als Prozentzahl der Basislinie angegeben. Der Mittelwert der ersten drei Proben ergibt 100 %. Student's t-Test (n = 8; Mittelwert + SEM)

3.5 Mikrodialyseversuche mit zentraler Substanzgabe (narkotisiertes Tier)

3.5.1 Vorversuche

In einem zusätzlichen Versuch an der wachen Ratte mit zentraler Gabe von 8-OH-DPAT über die Mikrodialysesonde in den LHA zeigte sich ein Anstieg der 5-HT-Freisetzung, der von einer starken Ausprägung des 5-HT-Syndroms begleitet war (keine Abbildung). Dieser Effekt war überraschend und es blieb unklar, ob der Anstieg über 5-HT_{1A}-Rezeptoren vermittelt wurde.

Da es bei der Beantwortung dieser Frage primär nicht um Nahrungsaufnahme ging und das 5-HT-Syndrom störend gewirkt hätte, wurden die diesbezüglichen Experimente in Versuchreihe B an der narkotisierten Ratte geprüft. Vorab sollte in einem Vorversuch gezeigt werden, dass eine intraperitoneale Gabe von 8-OH-DPAT auch bei der narkotisierten Ratte zu dem beim wachen Tier beschriebenen Abfall der 5-HT-Freisetzung führt.

Zwanzig Minuten nach systemischer Gabe von 300 µg/kg 8-OH-DPAT i.p. zeigte sich im Vergleich zu den NaCl-behandelten Kontrolltieren ein signifikanter Abfall von 5-HT im LHA, der mindestens bis 2 h nach Substanzgabe anhielt (Abb. 17).

Dies zeigt, dass es prinzipiell möglich ist, diese spezielle Fragestellung an der narkotisierten Ratte durchzuführen.

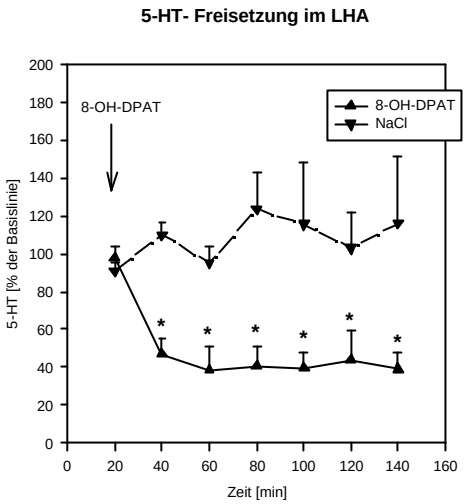

Abbildung 17: Wirkung von 8-OH-DPAT [300 µg/kg i.p.] auf die extrazelluläre 5-HT-Freisetzung im LHA der narkotisierten Ratte. Der erste Wert stellt den letzten Wert der Basislinie dar. Die Werte sind als Prozentzahl der Basislinie angegeben. Der Mittelwert der ersten drei Proben ergibt 100 %. ANOVA on Ranks gefolgt von Dunn's Test. (n = 8; Mittelwert + SEM; *p<0,05 gegenüber NaCl-behandelter Kontrolle).

3.5.2 8-OH-DPAT [in Hypothalamus]

Nach intrahypothalamischer Substanzgabe von 8-OH-DPAT über die Mikrodialysesonde zeigte sich ein signifikanter Anstieg von 5-HT im LHA in den ersten 20 min nach der Applikation (Abb. 18).

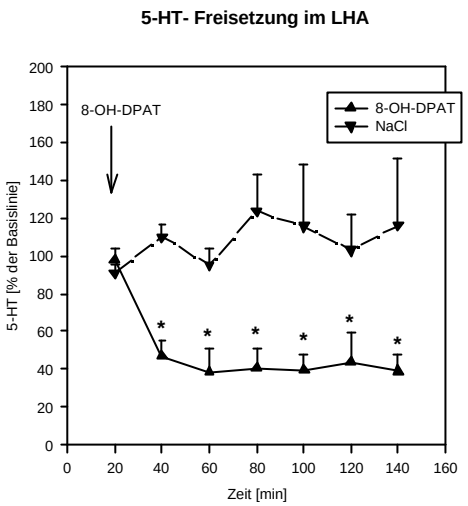

Abbildung 18: Wirkung von 8-OH-DPAT [2 x 10^{-6} M] in lokaler Applikation über die Mikrodialysesonde in den LHA auf die extrazelluläre 5-HT-Freisetzung der narkotisierten Ratte. Die Werte sind als Prozentzahl der Basislinie angegeben. ANOVA on Ranks gefolgt von Dunn's Test (n = 8; Mittelwert + SEM; *p<0,05 gegenüber Kontrolle)

3.5.3 WAY 100635 [in Hypothalamus]

Nach intrahypothalamischer Gabe des 5-HT_{1A}-Antagonisten WAY 100635 über die Mikrodialysesonde zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Effekt auf die 5-HT-Freisetzung im LHA (Abb. 19).

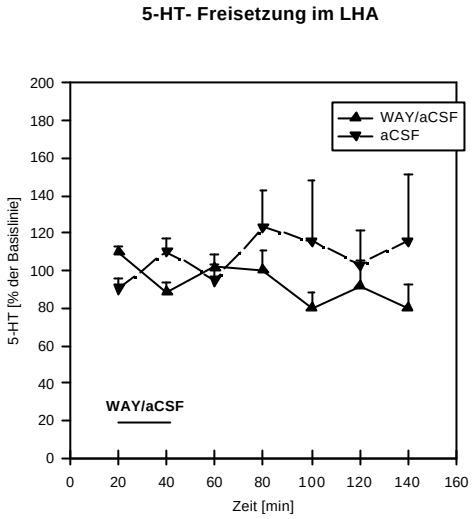

Abbildung 19: Wirkung von WAY 100635 [2 x 10^{-6}M] in lokaler Applikation über das Sondensystem in den LHA auf die extrazelluläre 5HT-Freisetzung der narkotisierten Ratte. Die Werte sind als Prozentzahl der Grundlinie angegeben. ANOVA on Ranks gefolgt von Dunn's Test (n = 8; Mittelwert + SEM)

3.5.4 8-OH-DPAT und WAY 100635 [in Hypothalamus]

Im Vergleich zu den Kontrolltieren war die 5-HT-Freisetzung nach lokaler Gabe von 8-OH-DPAT auch nach Vorbehandlung mit WAY 100635 signifikant erhöht. Beide Substanzen wurden jeweils über 20 min und in gleicher Dosis appliziert [2 x 10^{-6}M] (Abb. 20).

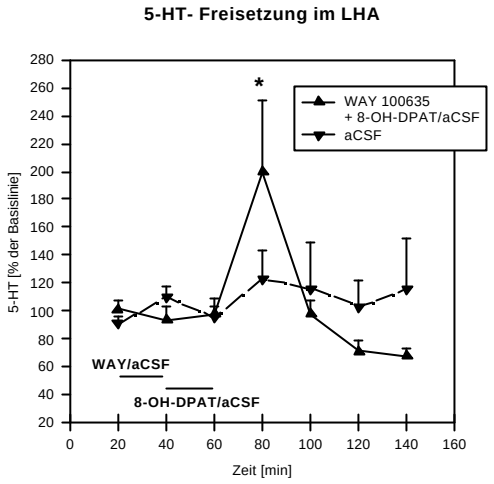

Abbildung 20: Wirkung von 8-OH-DPAT [2 x 10^{-6}M] nach Vorbehandlung mit WAY 100635 [2 x 10^{-6}M] in lokaler Applikation über die Mikrodialysesonde in den LHA auf die extrazelluläre 5-HT-Freisetzung der narkotisierten Ratte. Die Werte sind als Prozentzahl der Basislinie angegeben. ANOVA on Ranks gefolgt von Dunn's Test (n = 8; Mittelwert + SEM; *p<0,05 gegenüber Kontrolle)

Der Effekt von 8-OH-DPAT nach lokaler Gabe, dem eine Vorbehandlung mit WAY 100635 in gleicher Dosis [2 x 10^{-6} M] vorausging, wurde mit der Wirkung des Agonisten ohne Vorbehandlung verglichen. Der stimulierende Effekt von 8-OH-DPAT auf die 5-HT-Freisetzung im LHA wurde durch den Antagonisten WAY 100635 nicht geblockt (Abb. 21).

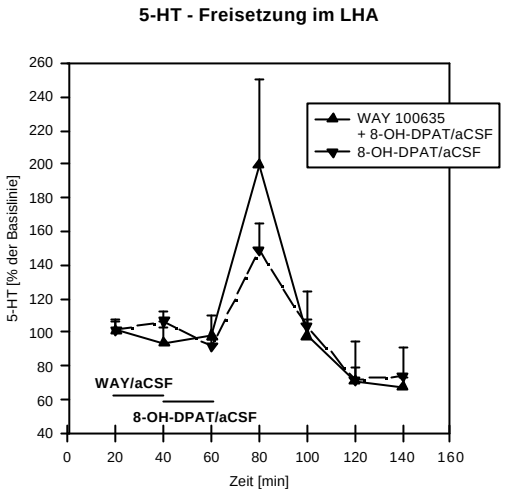

Abbildung 21: Wirkung von 8-OH-DPAT [2 x 10^{-6}M] nach Vorbehandlung mit WAY 100635 [2 x 10^{-6}M] in lokaler Applikation über das Sondensystem in den LHA auf die extrazelluläre 5-HT-Freisetzung der narkotisierten Ratte. Die Werte sind als Prozentzahl der Basislinie angegeben. Student's t-Test (n = 8; Mittelwert + SEM)

4 DISKUSSION

4.1 Methodische Versuche

4.1.1 Wiederfindungsrate der Mikrodialysesonden für 5-HT

Die Mikrodialyse ist eine Sammel- und Applikationstechnik, die es ermöglicht, die Konzentration von Substanzen im Extrazellularraum zu bestimmen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete intracerebrale Mikrodialyse ist eine geeignete Methode, um neurochemische Prozesse im Gehirn in Zusammenhang mit Verhaltensereignissen und/oder pharmakologischer Behandlung zu erfassen. Andererseits können Substanzen auch lokal über die Mikrodialysesonde appliziert werden.

Die Wiederfindung einer Substanz aus dem Extrazellularraum hängt von der Diffusion bzw. dem Konzentrationsgradienten an der Sondenmembran ab. Um diesen aufrecht zu erhalten, ist eine kontinuierliche Perfusion der Sonde notwendig. Ist die Fließgeschwindigkeit hoch, so steigt die absolute Substanzmenge, die in einer definierten Zeitspanne im Dialysat gewonnen werden kann. Der absolute Wiederfindungswert ist Schwankungen ausgesetzt, die durch Freisetzung aus dem Gewebe verursacht werden (Ungerstedt, 1991).

Eine entgegengesetzte Abhängigkeit besteht bei der relativen Wiederfindungsrate. Sie beschreibt die Konzentration einer bestimmten Substanz in der Probenflüssigkeit im Verhältnis zur Konzentration des Stoffes, welcher sich im die Dialysemembran umgebenden Gesamtmedium befindet.

Bei hohem Fluss steigt der Verdünnungseffekt im perfundierten Medium, die relative Wiederfindungsrate sinkt. Je minimaler der Fluss desto höher die relative Wiederfindungsrate. Das heißt, bei einem Fluss von Null wird die Konzentration in der Sonde identisch mit der Konzentration des Stoffes im umgebenden Medium. Dann wird auch die aus dem Dialysesystem gewonnene Substanzmenge gleich Null. Damit ist der absolute Wiederfindungswert gleich Null, die relative Wiederfindungsrate hingegen 100 %.

Neben der Perfusionsgeschwindigkeit ist der Wiederfindungswert abhängig von der Anfangskonzentration des Stoffes im perfundierten Medium, der Membranpassierbarkeit der Substanz, das heißt der Porengröße, und schließlich von der Gewebetemperatur.

Um einerseits einen möglichst hohen Wiederfindungswert und andererseits möglichst große Probenvolumina in geringer Zeit zu erhalten, muss eine optimale Fließgeschwindigkeit gefunden werden (Amberg und Lindefors, 1989).

Die Fließgeschwindigkeit wurde in den vorliegenden Versuchen mit 1 µl/min so langsam wie möglich gewählt, um Gewebeschäden und Auswascheffekte extrem gering zu halten. Andererseits gewährleistete diese Geschwindigkeit das Sammeln von ausreichenden Probenvolumina zur kontinuierlichen 20-minütigen 5-HT-Bestimmung.

Ein technischer Kompromiss musste ebenfalls in Bezug auf Wiederfindungswert und die Länge der Sonde gefunden werden. Dieser Zusammenhang war in Mikrodialyseversuchen von mehreren Autoren (Amberg und Lindefors 1989; Benveniste, 1989) beschrieben worden. Die technische Sondenentwicklung hatte zum Ziel, die Sondenlänge einerseits zu minimieren, um den Gewebeschaden gering zu halten, und andererseits die Länge zu maximieren, um eine höhere Wiederfindungsrate zu erlangen.

Es wurden Sonden mit 2 mm und 3 mm Länge geprüft. Sie wurden jeweils nach einmaligem und zweimaligem Gebrauch in Mikrodialyseversuchen untersucht.

Mit 22,2 % wiesen die 3 mm Sonden beim erstmaligem Gebrauch über eine Dauer von 20 h die höchste Wiederfindungsrate für 5-HT auf. Nicht signifikant geringer war die Rate mit 16,7 % nach dem zweiten Gebrauch (40 h) der gleichen Sonden. Nicht signifikant niedrigere Werte für die Wiederfindung wurden bei den 2 mm Sonden mit 15,7 % beim ersten und 13,8 % beim zweiten Gebrauch ermittelt.

Der Gebrauch der Sonden über einen Zeitraum von mehr als 20 h ist also nach unseren Versuchen mit gründlicher Sondenspülung (s. Tab. 3) ohne messbare Verluste in der Qualität möglich und ökonomisch sinnvoll. Ein längerer Gebrauch und dessen qualitative Auswirkungen auf die Wiederfindung müssten in weiteren Testreihen untersucht werden.

In den Mikrodialyseversuchen am wachen Tier entschieden wir uns für den Einsatz der 3 mm Sonden. Da die Versuche in der Regel mindestens 20 h dauerten, musste durch die längere Verweildauer und Durchspülung der Sonde mit einem Abfall der extrazellulären Konzentrationen von 5-HT im Dialysat gerechnet werden.

4.1.2 Postoperative Entwicklung der Körpermasse der Versuchstiere

Am ersten postoperativen Tag verloren die Tiere bis zu 6 % ihrer Ausgangskörpermasse. An den darauf folgenden 5 Tagen nahmen die Tiere allesamt stetig an KM zu und erreichten spätestens am 6. postoperativen Tag ihre Ausgangskörpermasse. Dies stimmt mit postoperativen Erholungszeiten in früheren Versuchen anderer Autoren überein (Hutson et al., 1986). Die Tiere wurden mit Erreichen ihrer Ausgangskörpermasse in die Dialyseversuche genommen.

Coudereau wies 1995 für Mäuse nach, dass die durch die OP bedingten isolierten Haltebedingungen über eine Dauer von 7 Tagen keine Veränderung in der Wirkung des 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten 8-OH-DPAT auf die Futteraufnahme zeigten.

Obgleich die intracerebrale Implantation der Mikrodialysesonde in Versuchen anderer Autoren einige postoperativ veränderte Parameter, wie verminderte Geschwindigkeit des Blutflusses, erhöhte Glukose-Verstoffwechselung und Änderungen in der Transmitterausschüttung zeigte, waren diese Veränderungen höchstens bis 24 h nach OP beobachtet worden. Nach 24 h stellten sich wieder die präoperativen Werte ein (Benveniste, 1989). Die Zeit bis zum Erreichen einer kontinuierlichen Grundlinie hängt von den analysierten Stoffen und ihren metabolischen Eigenschaften, aber auch von den operativen Methoden und Dialysetechniken ab (Ungerstedt, 1991).

In Versuchsreihe A mit peripherer Gabe von 8-OH-DPAT wurde die Sonde am Vortag in die Führungskanüle eingesetzt. In Versuchsreihe B mit zentraler Gabe unter Narkose der Tiere konnte die Sonde in stereotaktischer Operation direkt am Versuchstag ohne Führungskanüle ins Gehirn eingesetzt werden.

Nach einem Intervall von 60 min wurde mit der Sammlung von Proben zur 5-HT-Bestimmung begonnen. In der Regel wurden nach 120 min stabile Werte gemessen, und es erfolgte die Bestimmung der Basislinie.

4.2 Mikrodialyseversuche

Erstmals von Dourish et al. (1985) veröffentlicht, bestätigte sich in späteren Versuchsreihen, dass die Gabe des 5-HT_{1A}-Agonisten 8-OH-DPAT die Futteraufnahme bei Ratten steigert (Dourish, 1992). Dieser Effekt ist durch

somatodendritische Autorezeptoren vermittelt (Dourish et al., 1985; Hutson et al., 1986).

Das Ausmaß des stimulierenden Effekts auf die Futteraufnahme zeigte in unseren Versuchen allerdings eine Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen. In unseren Pilotversuchen stieg, wie oben erwähnt, nach intraperitonealer (i.p.) Gabe von 300 µg/kg 8-OH-DPAT die Futteraufnahme bei den Tieren mit freiem Futterzugang signifikant an. Mit NaCl-Lösung behandelte Tiere nahmen hingegen nur geringe Mengen an Futter (< 1g/2 h) auf.

Diese Hyperphagie nach Gabe von 8-OH-DPAT am frei fressenden Tier wurde nicht nur nach systemischer, sondern auch nach lokaler Gabe in die serotonergen Ursprungsgebiete, den Raphe-Kernen, beobachtet (Bendotti und Samanin, 1986; Hutson et al., 1988). Die lokale Gabe von 8-OH-DPAT in die Raphe führte zu keiner Veränderung der 5-HT-Freisetzung im Applikationsgebiet selbst (Adell et al., 1993), jedoch zu einem Abfall von 5-HT in den Projektionsgebieten. In Mikrodialyse-Versuchen an der narkotisierten Ratte untersuchten Kreiss und Lucki (1994) den Effekt von 8-OH-DPAT auf die 5-HT-Freisetzung in Striatum und Hippocampus. Nach systemischer Gabe des 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten fiel die 5-HT-Ausschüttung erwartungsgemäß ab. Nach lokaler Gabe von 8-OH-DPAT in die jeweiligen Projektionsgebiete zeigte sich kein Substanzeffekt. Lokale Gabe in die dorsale Raphe hingegen führte allein im Striatum zum 5-HT-Abfall, lokale Gabe in die mediane Raphe nur im Hippocampus. Damit ist die regionale Abhängigkeit des Effektes von 8-OH-DPAT auf die 5-HT-Freisetzung beschrieben.

In unseren Versuchen an nahrungskarenten Tieren konnte jedoch kein hyperphager Effekt von 8-OH-DPAT beobachtet werden. Unter gleicher Dosisgabe (300 µg/kg i.p.) zeigten diese Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe sogar eine signifikant geringere Futteraufnahme.

Die NaCl-behandelten oder mit einer Dosis von nur 100 µg/kg 8-OH-DPAT behandelten nahrungskarenten Tiere nahmen deutlich mehr Futter im Vergleich zu den frei fressenden Kontrolltieren auf.

Bendotti und Samanin (1987) stellten die Hypothese auf, dass sich das hypophage Verhalten nach Gabe von 8-OH-DPAT an nahrungskarenten Tieren durch die postsynaptische Wirkung des Agonisten erkläre. Dies führe zu einer

Interferenz zwischen Futteraufnahme und dem postsynaptisch ausgelösten 5-HT-Syndrom.

Dieses Syndrom („forepaw trading“, „head-weaving“, „hind limb abduction“,„straub tail“ und „flat body posture“) wurde unter 1.3.6 bereits beschrieben (Grahame, 1971; Jacobs, 1976; Curzon, 1999). Dourish et al. (1985) zeigten ebenfalls bei hungrigen Tieren hypermotorisches Verhalten nach Gabe von 8-OH-DPAT.

Im Gegensatz zu o.g. Autoren wurde jedoch auch eine Abnahme der Lokomotion nach 8-OH-DPAT am nahrungskarenten Tier beschrieben, wobei methodische Unterschiede, wie z.B. Applikationsart und Dosierung, bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen sind.

In unseren Versuchen zeigten sowohl die frei fressenden als auch die nahrungskarenten Tiere in den ersten 20 min nach Substanzgabe einen signifikanten Anstieg der Lokomotionswerte. Dies legt einen gleichartigen Wirkmechanismus des 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten bezogen auf Lokomotion am satten und hungrigen Tier nahe.

Kritik an der Hypothese, dass die postsynaptisch ausgelösten Lokomotionsveränderungen mit der Futteraufnahme interferieren, wurde von Ebenezer (1992) geübt. Er fand einen antiorexigenen Effekt von 8-OH-DPAT auch bei Dosen unter 100 µg/kg, die keine Stereotypien hervorriefen. Damit lag nahe, dass der hypophage Effekt durch andere Rezeptormechanismen ausgelöst sein musste als das 5-HT-Syndrom.

In den vorliegenden peripheren Versuchen wurde 8-OH-DPAT stets intraperitoneal appliziert. Da die Mikrodialysesonde mit Haltesockel am Kopf des Versuchstieres angebracht war, tangierte die intraperitoneale Applikation daher das Operationsgebiet im Gegensatz zur subcutanen Applikation nicht. Die Dosis von 8-OH-DPAT (i.p.) musste mit 300 µg/kg KM relativ hoch gewählt werden. Die ebenfalls gebräuchliche subkutane Applikation zeigt eine geringfügig höhere Anreicherung der Substanz im ZNS (Perry und Fuller, 1989) und eine etwas stärkere Wirksamkeit als die intraperitoneale Applikation (Fuller und Snoddy, 1987). Dies mag eine Erklärung dafür sein, dass das 5-HT-Syndrom trotz der hohen Dosierung des Agonisten in unseren Mikrodialyse- und Lokomotionsversuchen im Vergleich zu anderen Autoren (Dourish et al., 1985;

Hutson et al., 1988) nicht oder nur schwach ausgeprägt war.

Unsere Versuche legen daher den Schluss nahe, dass sich die unterschiedliche Wirkung des 5-HT_{1A}-Agonisten auf die hypothalamische 5-HT-Freisetzung bei frei fressenden und nahrungskarenten Ratten nicht in der Lokomotion widerspiegelt.

8-OH-DPAT vermindert die Freisetzung von extrazellulärem 5-HT im Hypothalamus durch seine Wirkung an somatodendritischen Autorezeptoren in den Raphe-Kernen. Dies konnte in früheren Experimenten gezeigt werden (Schwartz et al., 1990a; Lorrain et al., 1998). In unserem zweiten Mikrodialyseversuch konnten wir jedoch nachweisen, dass 8-OH-DPAT keine Wirkung auf die 5-HT-Freisetzung beim hungrigen Tier hat.

In zahlreichen Studien wurde versucht, den Mechanismus zu erklären, der für die unterschiedliche Wirkung von 8-OH-DPAT in Abhängigkeit vom Fütterungszustand ursächlich ist (in De Vry und Schreiber, 2000). Dabei kristallisierten sich zwei Erklärungshypothesen heraus, die die fehlende Wirkung von 8-OH-DPAT bei nahrungskarenten Ratten zu erklären versuchen:

1. Unterschiede im 5-HT-Metabolismus beim satten und beim hungrigen Tier
2. Unterschiede in Zahl und Funktion der 5-HT_{1A}-Rezeptoren beim satten und beim hungrigen Tier

Zum ersten Punkt: Die Synthese von 5-HT ist abhängig von der Menge und Verfügbarkeit an Tryptophan. Nach Nahrungskarenz wurden erhöhte Werte von Tryptophan im ZNS gemessen (Schweiger et al., 1989). In weiteren Vergleichen zwischen frei fressenden und nahrungskarenten Ratten wurden erhöhte Werte von 5-HIAA und 5-HT im Cortex, Striatum, Cerebellum und Mittelhirn der hungrigen Tiere gemessen (Knott und Curzon, 1974). Im Hypothalamus wurden gegensätzliche Ergebnisse gefunden (Knott und Curzon, 1974; Kantak et al., 1978). Die einzelnen Kerngebiete wiesen unterschiedliche Veränderungen im 5-HT- bzw. 5-HIAA-Gehalt nach Futterrestriktion auf. Loullis et al. (1979) bestätigten einen Anstieg von 5-HIAA im LHA nach 48 h Futterdeprivation. Der 5-HT-Gehalt blieb nach diesen Studien hingegen unverändert, was beides auf eine Steigerung des serotonergen Metabolismus hinweist. Im VMH wurden keine serotonergen Veränderungen beim nahrungskarenten Tier gefunden. Dies steht im Einklang mit den klassischen Läsionsversuchen (Anand und Brobeck, 1951), die den jeweiligen

hypothalamischen Kerngebiete erstmals spezifische Funktionen in der Nahrungsregulation zugeordnet hatten.

Fuenmayor und Garcia (1984) vermuteten, dass der erhöhte 5-HT-Metabolismus im Hypothalamus von einer gesteigerten neuronalen Transmitterausschüttung begleitet wird. Ergänzende Ansätze kamen von Schwartz et al. (1990b), die feststellten, dass peripheres Tryptophan beim nahrungskarenten Tier den hypothalamischen 5-HT-Spiegel leichter anheben konnte als bei Tieren, die ad libitum Futter erhielten.

In späteren Versuchen wurde das Futter-Restriktionsmodell von Haleem und Haider (1996) spezifiziert. Den Ratten, die Futter ad libitum erhielten wurde eine Gruppe von Ratten gegenübergestellt, die über 5 Tage an eine bestimmte Fresszeit (4 h) gewöhnt wurde. Nach 5 Tagen wurde der Hälfte dieser Gruppe für 2 h Futter angeboten, die andere Hälfte wurde ohne Futteraufnahme getötet. In den Gehaltsbestimmungen wurde ein signifikanter Abfall an 5-HT bei beiden vorher nahrungskarenten Gruppen gefunden. Der Metabolit 5-HIAA war in diesen beiden Gruppen erhöht. Dieses Ergebnis zeigt die offensichtlichen Veränderungen in Synthese und Metabolismus von 5-HT bei Ratten, die einem Nahrungsregime unterliegen. Durch Gehaltsbestimmungen von Tryptophan wurde in derselben Studie bei denjenigen Ratten, die im nahrungskarenten Zustand getötet wurden ein Anstieg der nicht gebundenen Form und ein Abfall des Gesamtgehaltes im Plasma gemessen. Der Zustand einer eingeschränkten Nahrungsaufnahme über einen längeren Zeitraum bewirkt auf biochemischer Ebene eine veränderte Aktivität des Enzyms Tryptophanhydroxylase und damit auch eine Veränderung der 5-HT-Verfügbarkeit.

Der Syntheseanstieg von 5-HTP nach Nahrungskarenz wurde in Zusammenhang mit der Tryptophan-Bindungskapazität an Albumin gesehen (Knott und Curzon, 1974).

Eine Verbindung der erstgenannten Hypothese zum unterschiedlichen 5-HT-Metabolismus beim satten und beim hungrigen Tier wurde von nachfolgenden Autoren untersucht. Dabei zeigte sich weder beim frei fressenden, noch beim nahrungskarenten Tier eine Korrelation des 5-HT-Anstiegs mit den Effekten des 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten. Der Einfluss von 8-OH-DPAT auf die 5-HTP-Synthese war weder beim satten noch beim hungrigen Tier nachzuweisen. In einer

Ausgangshypothese von Chaouloff et al. (1997) wurde vermutet, der Anstieg der neuronalen Aktivität serotonerger Zellen beim nahrungskarenten Tier bewirke eine Desensibilisierung der somatodendritischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren. Die Effekte der Nahrungskarenz auf den 5-HT-Metabolismus sind damit wahrscheinlich unabhängig von 5-HT_{1A}-Autorezeptoren. Vielmehr ist ein kompensativer Mechanismus denkbar, der beim nahrungskarenten Tier letztlich zu einem unveränderten extrazellulären 5-HT-Spiegel nach Stimulation am Autorezeptor führt. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse unserer Mikrodialysestudien bestätigt. Außerdem sind Interaktionen mit anderen serotonergen Rezeptoren oder die Involvierung weiterer Transmissionssysteme möglich.

Die zweite Hypothese fokussiert auf die Rezeptorebene.

Weniger klar als die bereits dargestellte Rolle der somatodendritischen ist die der postsynaptischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren für die Regulation der Futteraufnahme. Mit der Entdeckung von Glukose-sensitiven Neuronen (GSN) im LHA wurden weitere Erklärungsansätze gefunden (Anand 1961; Anand und Pillai, 1967). Diese Rezeptoren zeigten eine reduzierte elektrische Aktivität nach peripherer Infusion von Glukose und eine Aktivitätssteigerung nach Insulin-induzierter Hypoglykämie. Dem gegenüber reagierten Neurone im VMH, die als glukose-rezeptiv (GRN) bezeichnet werden, entgegengesetzt (Anand 1961; Anand und Pillai, 1967). Ursprungsgebiete der GSN-Projektionsfasern im LHA wurden im Hypothalamus selbst, im Tractus nucleus solitarius und in den dorsalen Raphe-Kernen vermutet (Bernardis und Bellinger, 1996; Orsini et al., 1992). Eine Interaktion von Fettsäuren und Peptiden mit GSN wurde nachgewiesen (Oomura, 1974).

Grunstein et al. (1986) untersuchten die Involvierung hypothalamischer Kerngebiete in den zentralen Steuerungsprozess des Blutglukosespiegels mittels weiterer Pharmaka. In seiner Studie verglich er die Aktivität von noradrenergen mit serotonergen Neuronen im Hypothalamus nach akuter und chronischer Therapie mit Tolbutamid, einem in der Inneren Medizin seit Jahrzehnten bekannten oralen Antidiabetikum aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe. Hierbei zeigte sich 10 min nach Gabe von Tolbutamid ein signifikanter Anstieg an NA, im weiteren Verlauf jedoch ein stetiger Anstieg von 5-HT und 5-HIAA. Eine vordem angenommene direkte Involvierung noradrenerger Systeme konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, jedoch ist eine Verbindung von 5-HT mit der extrapankreatischen

hypoglykämischen Wirkung von Tolbutamid sehr wahrscheinlich. Ein Anstieg der serotonergen Aktivität bei induzierter Hypoglykämie ließ sich weder nach 2-deoxyglukose noch nach chronischer Insulintherapie nachweisen (Grunstein et al., 1986). Dies widerspricht den oben dargestellten Ergebnissen von Anand (1961) und Anand und Pillai, (1967).

Versuche mit peripherer Gabe von 8-OH-DPAT zeigten einen Anstieg des Blutglukosespiegels, welcher nachweislich sowohl an postsynaptische 5-HT_{1A}-Rezeptoren als auch an adrenerge Systeme gekoppelt war. In Vergleichen zwischen hungrigen und satten Ratten zeigte sich bei den hungrigen Tieren eine abgeschwächte, aber länger anhaltende Hyperglykämie nach 8-OH-DPAT.

Jhanwar et al. (1994) bezog die Insulin-Glukose-Interaktion in den Sättigungsprozess mit ein. Eine Kopplung der hyperphagen Wirksamkeit von 8-OH-DPAT über präsynaptische Rezeptoren mit postsynaptisch regulierten Insulin- und Glukosespiegeln wurde vermutet. Nach peripherer Gabe von Tolbutamid zeigte sich eine erhöhte Dichte der 5-HT_{1A}-Rezeptoren im VMH, nicht jedoch im LHA. Demnach ändern sich die postsynaptischen Rezeptoren in Abhängigkeit von Glukose. Das heißt, beim hungrigen Tier mit niedrigem Glukosespiegel könnte die postsynaptische Rezeptordichte im Vergleich zum satten Tier mit hohem postprandialem Glukosespiegel verändert sein. Unterschiede in der Wirksamkeit von 8-OH-DPAT auf Futteraufnahme und 5-HT-Freisetzung ließen sich somit durch die beschriebenen Wechselwirkungen zwischen somatodendritischen und postsynaptischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren erklären.

Zusammengefasst lassen diese Studien vermuten, dass der ausbleibende Effekt des Agonisten 8-OH-DPAT beim hungrigen Tier wiederum nicht nur von Autorezeptoren, sondern von komplexen serotonergen Mechanismen, einschließlich postsynaptischer Rezeptoren abhängt. Orosco et al. (2000) lieferten in aktuellen Mikrodialysestudien Ergebnisse über die Aktivierung der hypothalamischen Insulinausschüttung nach lokaler Gabe eines 5-HT-Wiederaufnahmehemmers in den VMH. Umgekehrt bewirkt die lokale Insulingabe einen Anstieg der 5-HT-Freisetzung.

Da Nahrungsaufnahme den extrazellulären 5-HT-Spiegel im LHA erhöht, konnte dies auch in den Versuchen erwartet werden, in welchen den Ratten nach Substanzgabe Futter angeboten wurde. Die gewonnenen Mikrodialysedaten im

Experiment am satten Tier zeigen die Überschneidung von einerseits inhibitorischer Wirkung auf die 5-HT-Freisetzung durch den Agonisten und andererseits stimulierender Wirkung durch Futteraufnahme. Im entsprechenden Versuch am nahrungskarenten Tier erwarteten wir nach Futteraufnahme einen 5-HT-Anstieg. Das anders ausfallende Bild in diesem Versuch kann mehrere Ursachen haben: zum einen scheint die Aktivität des serotonergen Systems beim hungrigen Tier verändert zu sein, wie anhand des vorigen Versuchs am nahrungskarenten Tier diskutiert. Zum anderen hatte sich in den Versuchen zur Futteraufnahme ohne Mikrodialyse gezeigt, dass 8-OH-DPAT im Vergleich zu unbehandelten hungrigen Tieren Hypophagie auslöst. Auch unter Mikrodialysebedingungen war die Substanz-induzierte Verringerung der Futteraufnahme bei hungrigen Tieren zu messen. In diesen vorausgegangenen Versuchen belief sich der durch Futteraufnahme induzierte 5-HT-Anstieg auf knapp 164 % bezogen auf die Grundlinie (Voigt et al., 1998). In diesen Versuchen fraßen die Ratten mehr als in unseren vorliegenden Versuchen nach Gabe von 8-OH-DPAT. Damit ist wahrscheinlich, dass die verringerte Futteraufnahme beim hungrigen Tier nach 8-OH-DPAT nicht ausreichte, um einen signifikanten Anstieg der 5-HT-Freisetzung auszulösen (Voigt et al., 2000).

Es ist bekannt, dass eine zentrale Gabe von 8-OH-DPAT in die Raphe den gleichen Effekt wie nach systemischer Gabe hat, d.h. über Stimulierung somatodendritischer Autorezeptoren zu einer Steigerung der Futteraufnahme führt (Dourish et al., 1985; Fletcher und Davis, 1990). Nicht bekannt war, wie eine intrahypothalamische Gabe des Agonisten auf ein Gebiet, in dem postsynaptische Rezeptoren erwartet werden, wirken würde.

Ziel der zweiten Versuchsreihe war es daher, durch lokale Substanzgabe diese Rezeptoren im LHA zu stimulieren und damit die Wirkmechanismen am 5-HT-Rezeptor genauer zu erklären.

Die intrahypothalamische Applikation von 8-OH-DPAT über das Mikrodialysesystem löste in unseren Versuchen beim wachen Tier eine starke Ausprägung des 5-HT-Syndroms aus. Die pharmakologische Wirksamkeit war über diesen Applikationsweg damit gesichert. Zunächst sollte jedoch geklärt werden, inwieweit die Wirkung von 8-OH-DPAT auf die 5-HT-Freisetzung über den 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelt ist. Daher wurde mit agonistisch und antagonistisch

wirkenden Substanzen gearbeitet. Da die Futteraufnahme in diesen Versuchen nicht untersucht werden sollte und die massive Verhaltensänderung der Ratte nach zentraler Substanzgabe vergleichbare Versuchsbedingungen wie in Versuchsreihe A der peripheren Gabe nicht gewährleistet hätten, wurden die folgenden Versuche alle am narkotisierten Tier durchgeführt.

Die intraperitoneale Gabe von 8-OH-DPAT am narkotisierten Tier entsprach dem Effekt am wachen Tier und zeigte einen in früheren Versuchen anderer Autoren beschriebenen signifikanten Abfall in der 5-HT-Freisetzung im LHA innerhalb der ersten 20 min nach Substanzgabe (Lorrain et al., 1998; Schwartz et al., 1990a). Die Versuche an der narkotisierten Ratte konnten damit als Entsprechung zu den Versuchen an der frei beweglichen Ratte gelten.

Lokal über das Mikrodialysesystem in den LHA appliziert, erhöhte der Agonist die 5-HT-Freisetzung im LHA signifikant. Eine nur unspezifische Stimulation durch die lokale Applikationsart wurde durch die Kontrollgruppe ausgeschlossen, die eine intrahypothalamische Infusion über 20 min mit aCSF zugesetztem NaCl erhielten. Hier zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der 5-HT-Freisetzung.

In Fressversuchen an der frei fressenden Ratte hatte sich in früheren Versuchen nach intraventrikulärer Substanzgabe die gleiche hyperphage Wirkung wie nach systemischer Gabe gezeigt (Hutson et al., 1986). Allerdings waren nicht nur der LHA, sondern sämtliche Gehirnstrukturen Angriffsorte der Substanz. Angenommen wurde die Wirkung von 8-OH-DPAT an Autorezeptoren im Mittelhirn, die zu einem Abfall der 5-HT-Freisetzung führten.

Sowohl die durch 8-OH-DPAT induzierte Futteraufnahme (Fletcher et al., 1995) als auch der induzierte 5-HT-Abfall lassen sich durch systemische Gabe von WAY 100635 antagonisieren (Casanovas et al., 1997).

Am Anfang unserer Versuche mit WAY 100635 wurde zunächst die Eigenwirkung des 5-HT_{1A}-Rezeptorantagonisten ausgeschlossen. Nach Applikation über das Sondensystem zeigte sich keinerlei signifikante Veränderung in der 5-HT-Freisetzung im LHA. Dies bestätigt die spezifische Blockierung des Rezeptors ohne antagonistische Eigeneffekte, daher als stiller Antagonist („silent antagonist“) charakterisiert (Fletcher et al., 1996; Fletcher und Coscina, 1993; Routledge et al., 1993; Vickers et al., 1996). In Versuchen zur Futteraufnahme nach peripherer

Gabe des älteren 5-HT_{1A}-Rezeptorantagonisten WAY 100135 waren ebenfalls keine Veränderungen in der Feuerungsrate serotonerger Neuronen und der 5-HT-Freisetzung in der Raphe festgestellt worden. Die Applikation des Antagonisten alleine beeinflusste die Futteraufnahme nicht (Hartley und Fletcher, 1994).

WAY 100635 ist eine Substanz, die selektiv und ohne intrinsische Aktivität sowohl prä- als auch postsynaptisch am 5-HT_{1A}-Rezeptor angreift (Routledge et al., 1993). Die Ergebnisse wurden durch kinetische und Radioligandenstudien bestätigt. Dies ist vor allem relevant für *in vivo*-Experimente zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung des 5-HT_{1A}-Rezeptors.

Die Wirkung der zentralen Gabe von 8-OH-DPAT auf die 5-HT-Freisetzung konnte in unseren Versuchen durch Vorbehandlung mit dem Antagonisten WAY 100635 nicht geblockt werden.

Andererseits konnte in früheren Studien nachgewiesen werden, dass der Antagonist die verminderte 5-HT-Freisetzung nach peripherer Gabe von 8-OH-DPAT hemmte (Hartley und Fletcher, 1994). Des weiteren traten die von 8-OH-DPAT induzierte Hyperphagie, Hypothermie, das 5-HT-Syndrom und andere Verhaltensparameter durch Vorbehandlung mit dem Antagonisten nicht auf. Dies bestätigte, dass der Angriff von WAY 100635 am 5-HT_{1A}-Autorezeptor erfolgte. Die Kriterien eines selektiv wirksamen Antagonisten sind damit erfüllt (Fletcher et al., 1996). Die serotonerge Feuerungsrate in der dorsalen Raphe wurde durch WAY 100635 erhöht, was die Vermutung nahe legt, dass die dort lokalisierten 5-HT-Neuronen in ihrer Aktivität einer 5-HT_{1A}-Rezeptor-vermittelten Hemmung ausgesetzt sind (Routledge et al., 1993).

Durch Messungen in unterschiedlichen Hirngebieten konnte festgestellt werden, dass WAY 100635 den Effekt von 8-OH-DPAT auf die 5-HT-Freisetzung im frontalen Cortex antagonisieren, nicht jedoch in den zentralen Kerne der Amygdala, den Raphe-Kernen, Hippocampus und Striatum. Dies bestätigt die Komplexität der Regulation der 5-HT_{1A}-Rezeptoraktivität in verschiedenen Gehirnregionen (Casanovas et al., 1997). Der in unseren Versuchen beobachtete Anstieg in der 5-HT-Freisetzung nach lokaler Sondenapplikation in den LHA, der auch durch den Antagonisten nicht blockierbar war, kann damit nicht 5-HT_{1A}-Rezeptor-vermittelt sein. Dies wird gestützt durch Versuche von Assie und Koeck (1996), die an der narkotisierten Ratte nach lokaler Gabe von 8-OH-DPAT über

die Mikrodialysesonde einen Anstieg der 5-HT-Freisetzung im Hippocampus gemessen hatten. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Kreiss und Lucki (1994), die in den Projektionsgebieten nur regional abhängige Effekte nach lokaler Gabe von 8-OH-DPAT in serotonerge Ursprungsgebiete gefunden hatten. Assie und Koeck (1996) konnten in ihren Versuchen den Effekt von 8-OH-DPAT nicht antagonisieren.

Unsere Arbeit fokussierte auf die laterale Hypothalamusregion, die traditionell im Modell der „Fresszentren“ (siehe Einleitung) die Region ist, die Nahrungsaufnahme reguliert. Die wesentliche funktionelle Bedeutung dieser Region für die Regulation von Sättigungsprozessen des LHA wurde in unseren Versuchen bekräftigt. Die Rolle anderer hypothalamischer Strukturen wurde von Bernardis und Bellinger (1998) für den dorsomedialen Kern, von Leibowitz und Alexander (1998) für die paraventrikulären, ventromedialen und suprachiasmatischen Kerne beschrieben. Alle Strukturen spielen eine Rolle in physiologischen und pathophysiologischen Mustern des Nahrungsverhalten. Eine Kopplung zu den Effekten von Insulin und deren Entgleisung bei adipöser und diabetischer Stoffwechsellage konnte für alle Kerne gefunden werden.

Mit der Technik der intracerebralen Mikrodialyse konnte in unseren Versuchen die unterschiedliche Wirkung von 8-OH-DPAT auf die 5-HT-Freisetzung im LHA in Abhängigkeit von den Fressbedingungen dargestellt werden. Beim frei fressenden Tier besteht eine Interaktion zwischen 5-HT-Freisetzung nach Substanzgabe und gleichzeitiger Futteraufnahme. Dies lässt vermuten, dass ernährungsbedingte Verhaltenszustände die 5-HT-Freisetzung im LHA beeinflussen.

Es kristallisiert sich ein Modell zur Erklärung von Nahrungsverhalten heraus, das die Sequenz von Nahrungsaufnahme, Metabolismus der biochemischen Grundbausteine, Sättigung und Beendigung des Mahls differenzierter als in den traditionellen „Zentrumsmodellen“ betrachtet. 5-HT spielt zusammen mit Peptiden wie Galanin und NPY eine starke Rolle beim Beginn der Nahrungsaufnahme (Leibowitz und Alexander, 1998). Hierbei scheint durch serotonerge Bahnen der Energieverbrauch angestoßen zu werden, welcher Blutglukose und Blutcorticosteroide senkt. Die Stimulation der serotonergen Rezeptorsysteme führt zur direkten oder indirekten Involvierung zentraler (NA, DA, NPY u.a.) und peripherer (Insulin, Leptin u.a.) Substanzen (in Parker, 1999; Simansky, 1996).

Proteine, Kohlenhydrate und Fette werden auf unterschiedliche Weise in den Regulationsmechanismus eingebaut und stimulieren ihrerseits bereits die Synthese von Sättigungsfaktoren wie z.B. Leptin.

Beim Menschen ist die Bedeutung von 5-HT als zentraler Sättigungsvermittler bekannt. In der Klinik haben Pharmaka, die auf serotonerge Rezeptoren wirken, bereits Eingang in die Therapie gefunden. Widersprüchliche Ergebnisse in der Therapie von Essstörungen konnten mit dem 5-HT-Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin, dem 5-HT-Freisetzer und 5-HT-Wiederaufnahmehemmer *d*-Fenfluramin und Sibutramin, das sowohl die Wiederaufnahme von 5-HT als auch von NA hemmt, erzielt werden (Jimerson et al., 1990; Kaye, 1997, Ferguson, 1999).

Die gewichtsreduzierende Wirkung von Fluoxetin zeigte sich sowohl bei adipösen als auch bulimischen Patienten, allerdings nur in sehr hohen Dosen. Die Wirkung hielt nicht mehr als einige Wochen an, außerdem bedingte die hohe Dosis nicht tolerierbare dopaminerge Nebenwirkungen. Interessant ist jedoch, dass die Frequenz der Essattacken bei bulimischen Patientinnen vermindert wurde (Fluoxetine Bulimia Nervosa Collaborative Group [FBNCG], 1992). Gabe von Fluoxetin bei Patienten mit Anorexia nervosa bewirkte neben der bekannten antidepressiven und anxiolytischen Wirkung eine Gewichtszunahme (Gwirtsman et al., 1990; Kaye und Weltzin, 1991). Insgesamt gibt es jedoch für Fluoxetin noch immer wenige klinisch gesicherte Kontrollstudien.
d-Fenfluramin zeigte in der Therapie von Fresssucht die erwünschte hypophage und gewichtsreduzierende Wirksamkeit (Finer, 1992; Halford und Blundell, 2000a). Von besonderer klinischer Bedeutung war, dass der Gewichtsabfall über den bislang längsten medikamentös erreichten Zeitraum von einem Jahr anhielt. Dies wurde in multizentrischen internationalen *d*-Fenfluramin-Studien (INDEX) bestätigt. Der Effekt von *d*-Fenfluramin ist über serotonerge Autorezeptoren vermittelt und involviert über Genexpression Hypothalamus und Cortex (Javed et al., 1998). Wegen des Risikos eines pulmonalen Hochdrucks und anderer kardiovaskulärer Nebenwirkungen wurde die Substanz allerdings vom Markt genommen.

Sibutramin wirkt vergleichbar potent wie *d*-Fenfluramin, die Nebenwirkungsrate fiel jedoch wesentlich geringer aus, seit 1998 ist es in den USA erhältlich (Lean, 1997; Astrup, 1998).

Weitere experimentelle Studien an der Ratte zeigten, dass die durch ionisierte Strahlung induzierte Anorexie mit 8-OH-DPAT aufgehoben wurde und sogar ein Anstieg der Futteraufnahme resultierte (Winsauer et al., 1994). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Therapie der symptomatischen Anorexie, wie sie bei malignen Erkrankungen oder nach Bestrahlung auftritt, ebenfalls durch serotonerg wirkende Pharmaka verbessert werden könnte.

Die Essstörungen dominieren bei Mädchen und Frauen. Geschlechtsunterschiede bezüglich 5-HT-Metabolismus und 5-HT-Rezeptorebene wurden an Tier und Mensch beobachtet. So fand sich z.B. bei weiblichen Ratten im Gegensatz zu männlichen eine Bevorzugung von Kohlenhydraten in der Nahrungszusammensetzung und eine tageszeitliche Bevorzugung der Kohlenhydrataufnahme in der inaktiven Phase (Leibowitz, 1992). Bei Mädchen in der Pubertät wurden ähnliche Ernährungsmuster beobachtet (Drewnownoski et al., 1992). Bekannt ist, dass das serotonerge System bei chronischer Anorexie mit erhöhtem intrazellulärem Stoffwechsel reagiert, ein gegensätzlicher Effekt findet sich bei bulimischen Patientinnen (Kaye, 1997).

Weibliche Ratten weisen interessanterweise nicht nur eine höhere Anzahl von 5-HT_{1B}- und 5-HT_{1A}-Rezeptoren im VMH auf, sondern sprechen auch stärker auf serotonerge Wirkstoffe an (Gundlah et al., 1998). Hypothalamische 5-HT-Spiegel waren bei weiblichen Tieren in der östrogenen Zyklusphase signifikant niedriger als in der präöstrogenen Phase und als bei männlichen Tieren; Verbindungen zwischen 5-HT und luteinisierendem Hormon (LH), Follikel-stimulierendem Hormon (FSH), sowie den hypothalamischen Releasing-Hormonen (RH) wurden ebenso beschrieben wie spezifische Wirkungszusammenhänge zwischen Sexualhormonen und dem somatodendritischen 5-HT_{1A}-Rezeptor. Die Gabe von 8-OH-DPAT induzierte bislang nur bei männlichen Tieren Hyperphagie (in Ebenezer, 1994).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 5-HT eine wichtige Rolle in der Regulation von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht einnimmt. Die sättigenden Effekte von 5-HT werden durch verschiedene Rezeptorsubtypen vermittelt, wobei der 5-HT_{1A}-Rezeptor eine besondere Bedeutung hat. Wichtige Schaltstellen in der Regulation von Sättigung und Hunger sind die hypothalamischen Kerngebiete. Im lateralen Hypothalamus steigt die 5-HT-Freisetzung bei Nahrungsaufnahme.

Auf der Grundlage der unterschiedlichen Effekte des 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten 8-OH-DPAT auf die Nahrungsaufnahme bei satten und hungrigen Tieren stellten wir die Hypothese auf, dass die Wirkung von 8-OH-DPAT auf die 5-HT-Freisetzung im LHA mit den verschiedenen Fressbedingungen interferiert und sich in unterschiedlichen Mustern der 5-HT-Freisetzung abbilden lässt.

Die Ergebnisse unserer Mikrodialysemessungen von extrazellulärem 5-HT im LHA zeigten einen signifikanten Abfall der 5-HT-Freisetzung nach intraperitonealer Gabe von 8-OH-DPAT bei satten Ratten. Diese erhielten Futter ad libitum bis zur Substanzgabe. Wenn satte Ratten jedoch auch nach Substanzgabe Futterangebot hatten, wurde durch 8-OH-DPAT Nahrungsaufnahme induziert und die 5-HT-Freisetzung fiel nicht ab.

Bei hungrigen Ratten zeigte sich nach derselben Dosis von 8-OH-DPAT kein Effekt auf die 5-HT-Freisetzung. Die Freisetzung veränderte sich auch dann nicht signifikant, wenn den zuvor nahrungskarent gehaltenen Tieren nach Substanzgabe Futter angeboten wurde.

Zusätzlich wurde in einem zweiten Versuchsabschnitt 8-OH-DPAT über das Mikrodialysesystem lokal in den LHA appliziert. Dabei zeigte sich im Gegensatz zur systemischen Gabe jedoch ein Anstieg der 5-HT-Freisetzung. In anschließenden Versuchen wurde an der narkotisierten Ratte geprüft, ob dieser Effekt auch über den 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelt wird. Der 5-HT_{1A}-Antagonist WAY 100635 konnte den Effekt von 8-OH-DPAT nicht antagonisieren. Damit wurde ausgeschlossen, dass die stimulierende Wirkung einer lokalen Gabe von 8-OH-DPAT auf die 5-HT-Freisetzung über den 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelt wird.

Die vorliegende Studie zeigt damit erstmals die Wirkung von 8-OH-DPAT auf die 5-HT-Freisetzung im LHA in Abhängigkeit von unterschiedlichen Motivationszuständen in Verbindung mit Nahrungsaufnahme auf.

Sibutramin wird derzeit mit gutem Erfolg in der Adipositastherapie eingesetzt. In seiner Funktion als 5-HT-Wiederaufnahmehemmer wirkt er als Appetitzügler bei den Patienten.

Erkenntnisse weiterer experimenteller Forschungen sind Voraussetzung für das vertiefte pathophysiologische Verständnis der Regulation von Nahrungsaufnahme. Sie können Ansatzpunkte für die Durchführung weiterer klinischer

pharmakologischer Studien und somit für eine verbesserte Therapie von Essstörungen sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Serotonin (5-HT) nimmt eine wichtige Rolle in der Regulation von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht ein. Sowohl beim Tier als auch beim Menschen führt eine erhöhte 5-HT-Freisetzung zur Hemmung der Nahrungsaufnahme. Die Sättigung vermittelnden Effekte von 5-HT werden durch die 5-HT_{1B}-, 5-HT_{2A}- und 5-HT_{2C}-Rezeptorsubtypen vermittelt. So ist bekannt, dass Agonisten an diesen Rezeptorsubtypen die Nahrungsaufnahme vermindern.

Eine besondere Bedeutung hat der 5-HT_{1A}-Rezeptor im ZNS, der sowohl somatodendritisch als auch postsynaptisch vorliegt. Die Stimulation des somatodendritischen Autorezeptors mit 8-OH-DPAT vermindert die Freisetzung von 5-HT und löst bei satten Ratten Fressverhalten aus. Im Gegensatz dazu hemmt die Gabe von 8-OH-DPAT in gleicher Dosierung bei hungrigen Ratten die Futteraufnahme. Für diese Diskrepanz gab es bisher keine befriedigende Erklärung.

Wichtige Schaltstellen in der Regulation von Sättigung und Hunger sind die hypothalamischen Kerngebiete. Im lateralen Hypothalamus (LHA) steigt die 5-HT-Freisetzung bei Nahrungsaufnahme.

Auf der Grundlage der unterschiedlichen Effekte des 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten 8-OH-DPAT auf die Nahrungsaufnahme bei satten und hungrigen Tieren stellten wir die Hypothese auf, dass die Wirkung von 8-OH-DPAT auf die 5-HT-Freisetzung im LHA von den verschiedenen Motivationszuständen abhängt und sich in unterschiedlichen Mustern der 5-HT-Freisetzung abbilden lässt.

Die *in vivo*-Mikrodialyse stellt eine geeignete Methode zur Messung intracerebraler Veränderungen der 5-HT-Freisetzung dar. Die Bestimmung von extrazellulärem 5-HT aus dem Dialysat ermöglicht eine Messung des Konzentrationsverlaufs über einen Zeitraum von mehreren Stunden.

Wir führten Messungen von extrazellulärem 5-HT im LHA nach systemischer Gabe von 8-OH-DPAT unter vier verschiedenen Versuchsbedingungen durch:

1. Satte Ratte: Versuchstiere mit freiem Futterzugang bis zum Versuchende oder Versuchstiere mit freiem Futterzugang nur bis zur Substanzgabe.

2. Hungrige Ratte: ohne Futterzugang 16 h vor Versuchbeginn bis zum Ende des Versuchs oder ohne Futterzugang 16 h vor Versuchsbeginn, aber Futterangebot nach Substanzgabe.

Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Abfall der 5-HT-Freisetzung nach intraperitonealer Gabe von 300 µg/kg 8-OH-DPAT bei satten Ratten mit Futter ad libitum bis zur Substanzgabe. Wenn die satten Ratten jedoch auch nach Substanzgabe Futterangebot hatten, wurde durch 8-OH-DPAT Nahrungsaufnahme induziert, und die 5-HT-Freisetzung fiel nicht ab.

Bei hungrigen Ratten zeigte sich nach der gleichen Dosis von 8-OH-DPAT kein Effekt auf die 5-HT-Freisetzung. Die Freisetzung veränderte sich auch dann nicht signifikant, wenn den zuvor nahrungskarent gehaltenen Tieren nach Substanzgabe Futter angeboten wurde.

Die vorliegende Studie zeigt damit erstmals die Wirkung von 8-OH-DPAT auf die 5-HT-Freisetzung im LHA in Abhängigkeit von unterschiedlichen Motivationszuständen in Verbindung mit Nahrungsaufnahme auf.

Weiterhin wurde in einem zweiten Versuchsabschnitt 8-OH-DPAT über das Mikrodialysesystem lokal in den LHA appliziert. Dabei zeigte sich im Gegensatz zur systemischen Gabe jedoch ein Anstieg der 5-HT-Freisetzung. In anschließenden Versuchen wurde an der narkotisierten Ratte geprüft, ob dieser Effekt auch über den 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelt wird. Dazu wurde über die Mikrodialysesonde zunächst der 5-HT_{1A}-Antagonist WAY 100635 appliziert. Der Antagonist zeigte keine Eigenwirkung, konnte aber auch nicht den Effekt von 8-OH-DPAT antagonisieren. Damit wurde ausgeschlossen, dass die stimulierende Wirkung einer Gabe von 8-OH-DPAT in den LHA auf die 5-HT-Freisetzung über den 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelt wird.

Sibutramin wird derzeit mit gutem Erfolg in der Adipositastherapie eingesetzt. In seiner Funktion als 5-HT-Wiederaufnahmehemmer wirkt er als Appetitzügler bei den Patienten.

Erkenntnisse weiterer experimenteller Forschungen sind Voraussetzung für das vertiefte pathophysiologische Verständnis der Regulation von Nahrungsaufnahme. Sie können Ansatzpunkte für die Durchführung weiterer klinischer pharmakologischer Studien und somit für eine verbesserte Therapie von

Essstörungen sein.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Name
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
5-HTP	L-5-Hydroxytryptophan
8-OH-DPAT	8-Hydroxy-2(di-n-propylamino)tetralin
AC	Adenylatcyclase
aCSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
BMI	Body Mass Index
CCK	Cholecystokinin
DA	Dopamin
DRN	dorsale Raphe-Kerne
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
GRN	Glukose-rezeptive Neurone
GSN	Glukose-sensitive Neuronen
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
i.p.	intraperitoneal
KM	Körpermasse
LHA	lateraler Hypothalamus
LSD	Lysergsäurediäthylamid
MAO	Monoaminhydroxylase
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NPY	Neuropeptid Y
OP	Operation
SSRI	selektiver Serotonin-Wieder-aufnahmehemmer
VMH	ventromedialer Hypothalamus
WAY 100135	N-tert-butyl-3,4-(2-methoxyphenyl) piperazin-1-yl-2-phenylpropanamid
WAY 100635	N-2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl-N-(2-pyridinyl) cyclohexan carboxamid trihydrochlorid
ZNS	zentrales Nervensystem

LITERATURLISTE

Adell, A., Carceller, A., Artigas, F. (1993). In vivo brain dialysis study of the somatodendritic release of serotonin in the raphe nuclei of the rat: effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin. J.Neurochem., 60, 1673-1681.

Amberg, G., Lindefors, N. (1989). Intracerebral microdialysis: II. Mathematical studies of diffusion kinetics. J.Pharmacol.Methods*, 22*, 157-183.

Amin, A.H., Crowford, T.B.B., Gaddum, J.H. (1954) The distribution of substance P and 5-HT in the central nervous system of the dog. J.Physiol., 126, 596-618.

Anand, B.K. (1961). Glucoreceptor mechanisms in the hypothalamic feeding centers. J. Med.Res., 49, 717-724.

Anand, B.K., Brobeck, J.R. (1951). Localization of a „feeding center“ in the hypothalamus of rat. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 77, 323-324.

Anand, B.K., Pillai, R.V. (1967). Activity of single neurones in the hypothalamic feeding centres: effect of gastric distension. J.Physiol.Lond., *192*, 63-77.

Aoyagi, K., Oomura, Y., Shimizu, N. (1992). Concurrent measurement of serotonin metabolism and single neuron activity changes in the lateral hypothalamus of freely behaving rat. Behav.Brain Res., 49, 205-212.

Assie, M.B., Koek, W. (1996). Possible in vivo 5-HT reuptake blocking properties of 8-OH-DPAT assessed by measuring hippocampal extracellular 5-HT using microdialysis in rats. Br.J.Pharmacol., 119, 845-850.

Astrup, A. (1998). Sibutramine, an upcoming drug for weight loss acting on energy consumption and energy expenditure. Acta Med.Austriaca., 25, 146-149.

Aulakh, C.S., Wozniak, K.M., Haas, M., Hill, J.L., Zohar, J., Murphy, D.L. (1988). Food intake, neuroendocrine and temperature effects of 8-OH-DPAT in the rat. Eur.J.Pharmacol., 146, 253-259.

Azmitia, E.C., Whitaker-Azmitia, P.M. (1995) Anatomy, cell biology, and plasticity of the serotonergic system. In Bloom, F.E., Kupfer, D.J. (Hrsg.) Psychopharmacology: The forth generation of progress. Raven Press. New York.

Barnes, N.M., Sharp, T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. Neuropharmacology, 38, 1083-1152.

Baumgarten, H.G., Gröthert, M. (1997) Serotoninergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. Springer. Heidelberg.

Baumgarten, H.G., Grozdanovic, Z. (1995). Psychopharmacology of central serotonergic systems. Pharmacopsychiatry, 28, 73-79.

Baxter, G., Kennett, G., Blaney, F., Blackburn, T. (1995). 5-HT2 receptor subtypes: a family re-united? Trends Pharmacol.Sci., 16, 105-110.

Bendotti, C., Samanin, R. (1986). 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicits eating in free-feeding rats by acting on central serotonin neurons. Eur.J.Pharmacol., 121, 147-150.

Bendotti, C., Samanin, R. (1987). The role of putative 5-HT1A and 5-HT1B receptors in the control of feeding in rats. Life Sci., 41, 635-642.

Benveniste, H. (1989). Brain microdialysis. J.Neurochem., 52, 1667-1679.

Bernardis, L.L., Bellinger, L.L. (1996). The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. Neurosci.Biobehav.Rev., 20, 189-287.

Bernardis, L.L., Bellinger, L.L. (1998). The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998

update. Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 218, 284-306.

Bito, L., Davson, H., Levin, E., Murray, M., Snider, N. (1966). The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. J.Neurochem., 13, 1057-1067.

Blanchard, D.C., Shepherd, J.K., Rodgers, R.J., Blanchard, R.J. (1992). Evidence for differential effects of 8-OH-DPAT on male and female rats in the Anxiety/Defense Test Battery. Psychopharmacology, 106, 531-539.

Blanchard, R.J., Griebel, G., Guardiola, L.B., Brush, M.M., Lee, J., Blanchard, D.C. (1997). An ethopharmacological analysis of selective activation of 5-HT1A receptors: the mouse 5-HT1A syndrome. Pharmacol.Biochem.Behav., 57, 897-908.

Blundell, J.E. (1986). Serotonin manipulations and the structure of feeding behaviour. Appetite, *Suppl. 7*, 39-56.

Blundell, J.E., Halford J.C.G. (1998). Serotonin and appetite regulation. CNS Drugs, 9, 473-495.

Blundell, J.E., Lesem, M.B. (1975). The effect of 5-hydroxytryptophan on food intake and on the anorexic action of amphetamine and fenfluramine. J.Pharm.Pharmacol., 27, 31-37.

Brewerton, T.D. (1995). Toward a unified theory of serotonin dysregulation in eating and related disorders. Psychoneuroendocrinology, 20, 561-590.

Brewerton, T.D., Mueller, E.A., Lesem, M.D., Brandt, H.A., Quearry, B., George, D.T., Murphy, D.L., Jimerson, D.C. (1992) Neuroendocrine responses to m-chlorophenylpiperazine and L-tryptophan in bulimia. Arch.Gen.Psychiatry, 49, 852-861.

Broocks, A., Schweiger, U., Pirke, K.M. (1991). The influence of semistarvation-induced hyperactivity on hypothalamic serotonin metabolism. Physiol.Behav., 50, 385-388.

Brownell, U.D., Fairburn, C.G. (1995). Eating disorders and obesity: a comprehensive handbook. N.Y. In: Bulik, C.M. et al. Initial manifestations of disordered eating behavior: Dieting versus binging. Int.J.Eating Disord., 22, 195-201.

Casanovas, J.M. Lesourd, M., Artigas, F. (1997). The effect of the selective 5-HT1A agonist alnespirone (S-20499) and 8-OH-DPAT on extracellular 5-hydroxytryptamine in different regions of the brain. Br.J.Pharmacol., 122, 733-741.

Casanovas, J.M., Berton, O., Celada, P., Artigas, F. (2000). In vivo actions of the selective 5-HT1A receptor agonist BAY x 3702 on serotonergic cell firing and release. Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol., 362, 248-254.

Casanovas, J.M., Vitaro, M.T., Mengod, G., Artigas, F. (1999). Differential regulation of somatodendritic serotonin 5-HT1A receptors by 2-week treatments with the selective agonists alnespirone (S-20499) and 8-OH-DPAT: Microdialysis and autoradiographic studies in rat brain. J.Neurochem., 72, 262-272.

Chance, W.T., Balasubramaniam, A., Sheriff, S., Fischer, J.E. (1994). Possible role of neuropeptide Y in experimental cancer anorexia. Adv.Exp.Med.Biol., 354, 185-201.

Chaouloff, F. (1994). Effects of repeated 2-deoxy-D-glucose administration on ingestive, psychological, and 5-HT related behaviours in the rat. Neuropharmacology, 33, 693-703.

Chaouloff, F. Berton, O., Aquerre, S., Hay, M., Mormede, P. (1997). Effects of food deprivation on midbrain 5-HT1A autoreceptors in Lewis and SHR rats. Neuropharmacology, 36, 483-488.

Chazal, G., Ralston, H.J. (1987). Serotonin-containing structures in the nucleus raphe dorsalis of the cat: an ultrastructural analysis of dendrites and axon terminals. J.Comp.Neurol., 259, 317-329.

Clapham, J.C. Smith, S.A., Moore, G.B., Hughes, M.G., Azam, H., Scott, A., Jung, R.T. (1997). Plasma leptin concentrations and OB gene expression in subcutaneous adipose tissue are not regulated acutely by physiological hyperinsulinaemia in lean and obese humans. Intern.J.Obesity, 21, 179-183.

Clineschmidt, B.V. (1973). 5,6-Dihydroxytryptamine: suppression of the anorexigenic action of fenfluramine. Eur.J.Pharmacol., 24, 405-409.

Cooper, S.J. (1987). Palatability-induced food consumption is stimulated by 8-OH-DPAT. In Dourish, C.T. (Hrsg.) Brain 5-HT1A receptors. Chichester, 233-242.

Cooper, S.J. (1992). 5-HT and ingestive behaviour. In: Marsden, C.A., Heal, D.J. (Hrsg.) Central serotonin receptors and psychotropic drugs. Blackwell. Oxford, 260-291.

Coper, H., Helmchen, H. (1993). Psychopharmaka. In: Forth, W. (Hrsg.) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 6. Neuauflage. Wissenschaftsverlag. Mannheim, 282-291.

Coudereau, J.P. (1995). Effect of isolation on behavioral models involving serotonergic 5-HT2 and 5-HT1A receptors. Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry, 19, 931-942.

Currie, P.J., Coscina, D.V. (1993). Diurnal variations in the feeding response to 8-OH-DPAT injected into the dorsal or median raphe. Neuroreport, 4, 1105-1107.

Currie, P.J., Coscina, D.V. (1996). Metergoline potentiates natural feeding and antagonizes the anorectic action of medial hypothalamic 5-hydroxytryptamine. Pharmacol.Biochem.Behav., 53, 1023-1028.

Currie, P.J., Coscina, D.V., Fletcher, P.J. (1998). Reversal of fenfluramine and fluoxetine anorexia by 8-OH-DPAT is attenuated following raphe injection of 5,7-dihydroxytryptamine. Brain Res., 800, 62-68.

Curzon, G. (1990). Serotonin and appetite. Ann.N.Y.Acad.Sci., 600.

Curzon, G. (1999). Stereotyped and other motor responses to 5-hydroxy-tryptamine receptor activation. In: Cooper, S.J.; Dourish, C.T. (Hrsg.). Neurobiology of stereotyped behaviour. University Press. Oxford, 142-167

Dahlström, A., Fuxe, K. (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. Acta Physiol.Scan, 62, 1-55

Davidson, C., Stamford, J.A. (1995). Evidence that 5-hydroxytryptamine release in rat dorsal raphe nucleus is controlled by 5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT1D autoreceptors. Br.J.Pharmacol., 114, 1107-1109.

De Vry, J., Schreiber, R. (2000). Effects of selected serotonin 5-HT(1) and 5-HT(2) receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. Neursci. Biobehav.Rev., 24, 341-353.

Delgado, J.M.R. (1972). Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. Arch.Int.Pharmacodyn., 198, 9-12.

Dilling. H. (Hrsg.) (1999). Internationale Klassifikation psychischer Störungen. ICD-10 Kapitel V (F), Klinisch diagnostische Leitlinien, Weltgesundheitsorganisation. Verlag Hans Huber. Bern, 199-205.

Dourish, C.T. (1993) 5-HT receptor subtypes and feeding behaviour. In: Bradley, P.B. et al. (Hrsg.). Serotonin, CNS receptors and brain function. Pergamon Press. Oxford, 179-202.

Dourish, C.T., Hutson, P.H., Curzon, G. (1985). Low doses of the putative serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicit feeding in the rat. Psychopharmacology, 86, 197-204.

Drewnowski, A., Kurth. C., Holden-Wiltse, J., Saari, J. (1992). Food preferences in human obesity: Carbohydrates versus fats. Appetite,18, 207-221.

Ebenezer, I.S. (1992). Effects of the 5-HT1A agonist 8-OH-DPAT on food intake in food-deprived rats. Neuroreport, 3, 1019-1022.

Ebenezer, I.S. (1994). Sex difference in the feeding responses of non-deprived rats to the 5-HT1A-Agonist 8-OH-DPAT and gepirone. Meth.Find.Exp.Clin. Pharmacol., 16, 91-96.

Ellrott, T. (2000). Current drug formulations in obesity therapy. Dtsch.Med.Wochenschr., 125, 256-261.

Ferguson, C.P. (1999). Are serotonin selective reuptake inhibitors effective in underweight anorexia nervosa? Int.J.Eating Disord., 25, 11-17.

Fichter, M.M. (1993). Drug treatment of anorexia nervosa and bulimia nervosa. A review. Nervenarzt, 64, 21-35.

Finer, N. (1992). Body weight evolution during dexfenfluramine treatment after initial weight control. Int.J.Obes.Relat.Metab.Disord., 16, 25-29.

Fink, H., Morgenstern, R. (1995). Transmissionsprozesse in „grauen Zellen“. Humboldt-Spektrum, 4, 14-19.

Fletcher, P.J., Coscina, D.V. (1993). Injecting 5-HT into the PVN does not prevent feeding induced by injecting 8-OH-DPAT into the raphe. Pharmacol.Biochem.Behav., 46, 487-491.

Fletcher, P.J., Davies, M. (1990). Dorsal raphe microinjection of 5-HT and indirect 5-HT agonists induces feeding in rats. Eur.J.Pharmacol., 184, 265-271.

Fletcher, P.J., Forster, E.A., Bill, D.J. (1996) Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY 100635, a potent, selective and silent 5-HT1A receptor antagonist. Behav.Brain Res., 73, 337-353.

Fletcher, P.J., Tampakeras, M., Yeomans, J.S. (1995). Median raphe injections of 8-OH-DPAT lower frequency thresholds for lateral hypothalamic self-stimulation. Pharmacol.Biochem.Behav., 52, 65-71.

Fluoxetine Bulimia Nervosa Study Group (1992). Fluoxetine in the treatment of bulimia nervosa. A multi-center, placebo-controlled, double-blind trial. Arch.Gen. Psychiatry, 24, 139-147.

Friedman, J.M., Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature, 395, 763-770.

Fuenmayor, L.D., Garcia, S. (1984). The effect of fasting on 5-hydroxytryptamine metabolism in brain regions of the albino rat. Br.J.Pharmacol., 83, 357-362.

Fuller, R.W., Snoody, H.D. (1987). Influence of route of administration on potency of the selective 5-HT1A agonist, 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, in rats. Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol., 58, 409-412.

Fuxe, K. (1965). Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. Acta Physiol.Scand., 247, 39-85.

Gaddum, J.H. (1961). Push pull cannulae. J.Physiol., 137, 375-377.

Galloway, M.P., Suchowski, C.S., Keegan, M.J., Hjorth, S. (1993). Local infusion of the selective 5HT-1B agonist CP-93,129 facilitates striatal dopamine release in vivo. Synapse, 15, 90-92.

Gibbs, J., Smith, G.P. (1989). Cholecystokinin and satiety: problems in brain-gut interactions. In: Taché, Y. (Hrsg.) Brain-gut interactions. CRC Press. Boca Raton, 255-262.

Glazer, G. (2001) Long term pharmacotherapy of obesity: A review of efficacy and safety. Arch.Intern.Med., 161, 1814-1824.

Grahame, S.D. (1971). Studies in vivo on the relationship between brain tryptophan, brain 5-HT synthesis and hyperactivity in rats treated with a monoamine oxidase inhibitor and L-tryptophan. J.Neurochem., 18, 1053-1066.

Grignaschi, G., Mantelli, B., Fracasso, C., Anelli, M., Caccia, S., Samanin, R. (1993). Reciprocal interaction of 5-hydroxytryptamine and cholecystokinin in the control of feeding patterns in rats. Br.J.Pharmacol., 109, 491-494.

Grignaschi, G., Sironi, F., Samanin, R. (1996). Stimulation of 5-HT2A receptors in the

paraventricular hypothalamus attenuates neuropeptide Y-induced hyperphagia through activation of corticotropin releasing factor. Brain Res., 708, 173-176.

Grunstein, H.S., Smythe, G.A., Bradshaw, J.E., Compton, P.J. (1986). Tolbutamide increases hypothalamic serotonin activity in the rat. Diabetes, 35, 475-480.

Gundlah, C., Simon, L.D., Auerbach, S.B. (1998). Differences in hypothalamic serotonin between estrous phases and gender: an in vivo microdialysis study. Brain Res., 785, 91-96.

Gwirtsman, H.E., Guze, B.H., Yager, J., Gainsley, B. (1990). Fluoxetine treatment of anorexia nervosa: an open clinical trial. J.Clin.Psychiatry, 51, 378-382.

Haleem, D.J., Haider, S. (1996). Food restriction decreases serotonin and its synthesis rate in the hypothalamus. Neuroreport, 7, 1153-1156.

Halford, J.C., Blundell, J.E. (2000a). Pharmacology of appetite suppression. Prog.Drug.Res., 54, 25-58.

Halford, J.C., Blundell, J.E. (2000b). Separate systems for serotonin and leptin in appetite control. Ann.Med., 32, 222-232.

Hartley, J.E., Fletcher, A. (1994). The effects of WAY-100135 and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin on feeding in the rat. Eur.J.Pharmacol., 252, 329-332.

Hernandez, L. (1991). Hypothalamic serotonin in treatments for feeding disorders and depression as studied by brain microdialysis. J.Clinic Psychiatry, 52/12 , 32-40.

Hill, D.R., Woodruff, G.N. (1990). Differentiation of central cholecystokinin receptor binding sites using the non-peptide antagonists MK-329 and L-365,260. Brain Res., 526, 276-283.

Hjorth, S., Carlsson, A., Lindberg, P. (1982) 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, 8-OH-DPAT, a potent and selective agonist simplifies ergot congener with central 5-HT receptor stimulating activity. J.Neural.Transm., 55, 169-188.

Hjorth, S., Sharp, T. (1991). Effect of the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by in vivo microdialysis. Life Sci., 48, 1779-1786.

Houpt, T.A. (2000). Molecular neurobiology of ingestive behavior. Nutrition, 16, 827-836.

Hoyer, D., Clark, D.E., Fozard, J.R., et al. (1994) International union of pharmacological classification of receptors for 5-hydroxy-tryptamine (serotonin). Pharmacol.Rev., 46, 157-193.

Hoyer, D., Martin, G. (1997). 5-HT receptor classification and nomenclature: Towards a harmonization with the human genome. Neuropharmacology, 36, 419-428.

Huether, G. (1998). Essen, Serotonin und Psyche. Deutsches Ärzteblatt, 95, 477-479.

Hutson, P.H., Dourish, C.T., Curzon, G. (1988). Evidence that the hyperphagic response to 8-OH-DPAT is mediated by 5-HT1A receptors. Eur.J.Pharmacol., 150, 361-366.

Hutson, P.H., Sarna, G.S., Sahakian, B.J., Dourish, C.T., Curzon, G. (1986). Monitoring 5-HT metabolism in the brain of the freely moving rat. Ann.N.Y.Acad.Sci., 473, 321-336.

Innis, R.B., Snyder, S.H. (1980). Distinct cholecystokinin receptors in brain and pancreas. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 77, 6917-6921.

Jackson, H.C., Needham, A.M., Hutchins, L.J., Mazurkiewicz, S.E., Heal, D.J. (1997). Comparison of the effects of sibutramine and other monoamine reuptake inhibitors on food intake in the rat. Br.J.Pharmacol., 121, 1758-1762.

Jacobs, B.L. (1976). An animal behavior model for studying central serotonergic synapses. Life Sci., 19, 777-785.

Javed, A., Van de, K.L., Gray, T.S. (1998). The 5-HT1A and 5-HT2A/2C receptor antagonists WAY-100635 and ritanserin do not attenuate d-fenfluramine-induced fos expression in the brain. Brain Res., 791, 67-74.

Jhanwar, U.M., Moorjani, B., Kahn, A.H. (1994). Indications of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor interactions in feeding behavior and neuroendocrine regulation. Brain Res., 646, 247-257.

Jimerson, D.C., Lesem, M.D., Kaye, W.H., Hegg, A.P., Brewerton, T.D. (1990). Eating disorders and depression: is there a serotonin connection? Biol. Psychiatry, 28, 443-454.

Jolicoeur, F.B., Bouali, S.M., Fournier, A., St-Pierre, S. (1995). Mapping of hypothalamic sites involved in the effects of NPY on body temperature and food intake. Brain Res.Bull., 36, 125-129.

Joyce, D., Mrosovsky, N. (1964). Eating, drinking and activity in rats following 5-hydroxytryptophan (5-HTP) administration. Psychopharmacologia, 5, 417-423.

Kantak, K.M., Wayner, M.J., Stein, J.M. (1978). Effects of various periods of food deprivation on serotonin synthesis in the lateral hypothalamus. Pharmacol.Biochem.Behav., 9, 535-541.

Kaplan, J.M., Donahey, J., Baird, J.P., Simansky, K.J., Grill, H.J. (1997). d-fenfluramine anorexia: dissociation of ingestion rate, meal duration, and meal size effects. Pharmacol.Biochem.Behav., 57, 223-229.

Kaye, W.H. (1997). Persistent alterations in behavior and serotonin activity after recovery from anorexia and bulimia nervosa. Ann.N.Y.Acad.Sci., 817, 162-178.

Kaye, W.H., Weltzin, T.E. (1991). Neurochemistry of bulimia nervosa. J.Clin.Psychiatry, 52, 21-28.

Kennett, G.A., Wood, M.D., Bright, F., et al. (1997a). SB 242084, a selective and brain penetrant 5-HT2C receptor antagonist. Neuropharmacology, 36, 609-620.

Kennett, G.A., Ainsworth, K., Trail, B., Blackburn, T.P. (1997b). BW 723C86, a 5-HT2B receptor agonist, causes hyperphagia and reduced grooming in rats. Neuropharmacology, 36, 233-239.

Knott, I., Cruzon, G. (1972) Free tryptophan in plasma and brain Tryptophan metabolism. Nature, 239, 452-453.

Kreiss, D.S., Lucki, I. (1994). Differential regulation of serotonin (5-HT) release in the striatum and hippocampus by 5-HT1A autoreceptors of the dorsal and median raphe nuclei. J.Pharmacol.Exp.Ther., 269, 1268-1279.

Lean, M.E. (1997). Sibutramine - a review of clinical efficacy. Int.J.Obes.Relat.Metab.Disord., 21, 30-36.

Lee, M.D., Simansky, K.J. (1997). CP-94, 253: a selective serotonin1B (5-HT1B) agonist that promotes satiety. Psychopharmacology, 131, 264-270.

Leferink, S. (1999). Adipositas: Realistische Aspekte für die Praxis. Zeitschr. Allgemeinmed., 75, 437-440.

Leibowitz, S.F. (1995). Brain peptides and obesity: pharmacologic treatment. Obes.Res., 3, 573-589.

Leibowitz, S.F., Alexander, J.T. (1998). Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. Biol.Psychiatry, 44, 851-864.

Levin, B.E., Routh, V.H. (1996). Role of the brain in energy balance and obesity. Am.J.Physiol., 271, 491-500.

Logue, A.W. (1998). Die Psychologie des Essens und Trinkens. Spectrum Akadem. Verlag. Heidelberg.

Lorrain, D.S., Matuszewich, L., Hull, E.M. (1998). 8-OH-DPAT influences extracellular levels of serotonin and dopamine in the medial preoptic area of male rats. Brain Res., 790, 217-223.

Loullis, C.C., Felten, D.L., Shea, P.A. (1979). HPLC determination of biogenetic amines in discrete brain areas in food deprived rats. Pharmacol.Biochem.Behav., 11, 89-93.

Lu, J.Q., Nagayama, H. (1997). Circadian rhythm in the function of central 5-HT1A receptors is endogenous in nature. Cell Mol.Life Sci., 53, 224-226.

Lucas, A.R., Beard, C.M., O'Fallon, W.M., Kurland, L.T. (1991) 50-year trends in the incidence of anorexia nervosa in Rochester, Minn.: a population-based study. Am.J. Psychiatry, 148, 917-922.

Lucki, I. (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. Biol. Psychiatry, 44, 151-162.

Malagie, I., Trillat, A.C., Douvier, E., Anmella, M.C., Dessalles, M.C., Jacquot, C., Gardier, A.M. (1996). Regional differences in the effect of the combined treatment of WAY 100635 and fluoxetine: an in vivo microdialysis study. Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol., 354, 785-790.

McLaughlin, C.L., Clifton A. B. (1980). Feeding and drinking behavior responses of adult Zucker obese rats to cholecystokinin. Physiol.Behav., 25, 535-541.

Meguid, M.M., Fetissoc, S.O., Varma M., Sato, T., Zhang, L., Laviano, A., Rossi-Fanelli, F. (2000). Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. Nutrition, 16, 843-857.

Nedvidkova, J., Papezova, H., Haluzik, M., Schreiber, V. (2000) Interaction between serum leptin levels and hypothalamo-hypophyseal-thyroid axis in patients with anorexia nervosa. Endocr.Res., 26, 219-230.

Neill, J.C., Cooper, S.J. (1989). Evidence that d-fenfluramine anorexia is mediated by 5-HT1 receptors. Psychopharmacology, 97, 213-218.

Oomura, Y. (1974). Glucose inhibition of the glucose-sensitive neurons in the rat lateral hypothalamus. Nature, 247, 284-286.

Orosco, M., Rouch, C., Gerozissis, K. (2000). Activation of hypothalamic insulin by serotonin is the primary event of the insulin-serotonin interaction involved in the control of feeding. Brain.Res., 872, 64-70.

Orosco, M., Rouch, C., Nicolaidis, S. (1996). Rostromedial hypothalamic monoamine changes in response to intravenous infusions of insulin and glucose in freely feeding obese Zucker rats: a microdialysis study. Appetite, 26, 1-20.

Orosco, M., Trouvin, J.H., Cohen, Y., Jacquot, C. (1986). Ontogeny of brain monoamines in lean and obese female Zucker rats. Physiol.Behav., 36, 853-856.

Orsini, J.C., Armstrong, D.L., Wayner, M.J. (1992). Responses of lateral hypothalamic neurons recorded in vitro to moderate changes in glucose concentration. Brain Res.Bull., 29, 503-505.

Parker, E.M. (1999). The role of central neuropeptides, neurotransmitter and hormonal systems in the regulation of body weight. Neurotransmission,15, 3-11.

Paxinos, G., Watson, C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. New York.

Peroutka, S.J (Hrsg.) (1991). Serotonin receptor subtypes. Basic and clinical aspects. Wiley-Liss. New York.

Perry, K.W., Fuller, R.W. (1989). Determination of brain concentrations of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin by liquid chromatography with electrochemical detection. Biochem.Pharmacol., 38, 3169-3173.

Poeschla, B., Gibbs, J., Simansky, K.J., Smith, G.P. (1992). The 5-HT1A agonist 8-OH-DPAT attenuates the satiating action of cholecystokinin. Pharmacol.Biochem.Behav., 42, 541-543.

Raiteri, M., Bonanno, G., Vallebuona, F. (1995). In vitro and in vivo effects of d-fenfluramine: no apparent relation between 5-hydroxytryptamine release and hypophagia. J.Pharmacol.Exp.Ther., 273, 643-649.

Remschmidt, H., Schmidt, M.H (Hrsg.) (1990). Anorexia Nervosa. Hogrefe and Huber Publishers. Toronto, Lewistown, NY.

Rex, A. (1995). Verhaltenspharmakologische und neurochemische Untersuchungen zu Interaktionen zwischen dem Neuropeptid Cholezystokinin und dem Neurotransmitter Serotonin (Dissertation). Berlin.

Roth, J.D., Rowland, N.E. (1998). Efficacy of administration of dexfenfluramine and phentermine, alone and in combination, on ingestive behavior and body weight in rats. Psychoharmacology, 137, 99-106.

Routledge, C. (1994). In vivo characterization of the putative 5-HT1A receptor antagonist SDZ 216,525 using two models of somatodendritic 5-HT1A receptor function. Neuropharmacology, 33, 359-366.

Routledge, C., Gurling, J., Wright, I.K., Dourish. C.T. (1993). Neurochemical profile of the selective and silent 5-HT1A receptor antagonist WAY100135: an in vivo microdialysis study. Eur.J.Pharmacol., 239, 195-202.

Rueter, L.E. (1997). A critical review of 5-HT brain microdialysis and behavior. Rev.Neurosci., 8, 117-137.

Russell, G. (1979). Bulimia nervosa: an ominous variant of anorexia nervosa. Psychol.Med., 9, 429-448.

Samanin, R., Bendotti, C., Candelaresi, G., Garattini, S. (1977). Specificity of serotoninergic involvement in the decrease of food intake induced by quipazine in the rat. Life Sci., 21, 1259-1266.

Sanders-Bush, E. (1988). The serotonin receptors. Humana Press, NJ.

Schwartz, D.H., Hernandez, L., Hoebel, B.G. (1990a). Serotonin release in lateral and medial hypothalamus during feeding and its anticipation. Brain Res.Bull., 25, 797-802.

Schwartz, D.H., Hernandez, L., Hoebel, B.G. (1990b). Tryptophan increases extracellular serotonin in the lateral hypothalamus of food-deprived rats. Brain Res.Bull., 25, 803-807.

Schwedt, G. (1994). Chromatographische Trennmethoden. Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen. Thieme. Stuttgart

Schweiger, U., Broocks, A., Tuschl, R.J., Pirke, K.M. (1989). Serotonin turnover in rat brain during semistarvation with high-protein and high-carbohydrate diets. J.Neural.Transm., 77, 131-139.

Shiraishi, T., Oomura, Y., Sasaki, K., Wayner, M.J. (2000) Effects of leptin and orexin-A on food intake and feeding related hypothalamic neurons. Physiol.Behav., 71, 251-261.

Silver, G.P., Morley, J.E. (1991). Role of CCK in regulation of food intake. Progr.Neurobiol., 36, 23-34.

Simansky, K.J. (1996). Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. Behav.Brain Res., 73, 37-42.

Simansky, K.J. (1998). Serotonin and the structure of satiation. In: Smith, G.P. (Hrsg.), Satiation: From gut to brain. Oxford University Press. New York, 217-262.

Smith, G.P., Gibbs, J. (1975). Cholecystokinin: a putative satiety signal. Pharmacol.Biochem.Behav., 3, 135-138.

Stallone, D., Nicolaidis, S., Gibbs, J. (1989) Cholecystokinin-induced anorexia depends on serotoninergic function. Am.J.Physiol., 256, R1138-1141.

Tatemoto, K., Carlquist, M., Mutt, V. (1982) Neuropeptide Y – a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. Nature, 15, 659-660.

Tecott, L.H., Sun, L.M., Akana, S.F., Strack, A.M., Lowenstein, D.H., Dallman, M.F., Julius, D. (1995). Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT2C serotonin receptors. Nature,

374, 542-546.

Tricklebank (1996). The antipsychotic potential of subtype-selective 5-HT receptor ligands based on interactions with mesolimbic dopamine system. Behav.Brain Res., 73, 15.

Trillat, A.-C. (1998). Synergistic neurochemical and behavioral effects of flouxetine and 5-HT1A receptor antagonists. Europ.J.Pharmacol., 357, 179-184.

Unger, K.K. (1989). Handbuch der HPLC. Teil 1. GIT Verlag

Unger, R.H., Orci, L. (2001). Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. FASEB J., 15, 312-321.

Ungerstedt, U. (1991). Introduction to cerebral microdialysis. In: Microdialysis in the Neurosciences Robinson, T.E., Justice, J.B. Jr., Elsevier Science, 3-18.

Vertes, R.P., Martin, G.F. (1988). Autoradiographic analysis of ascending projections from the pontine and mesencephalic reticular formation and the median raphe nucleus in the rat. J.Comp.Neurol., 275, 511-541.

Vickers, S.P., Clifton, P.G., Dourish, C.T. (1996). Behavioural evidence that d-fenfluramine-induced anorexia in the rat is not mediated by the 5-HT1A receptor subtype. Psychopharmacology, 125, 168-175.

Voigt, J.P., Kienzle, F., Sohr, R., Rex, A., Fink, H. (2000). Feeding and 8-OH-DPAT-related release of serotonin in the rat lateral hypothalamus. Pharmacol.Biochem.Behav., 65, 183-189.

Voigt, J.P., Sohr, R., Fink, H. (1998). CCK-8S facilitates 5-HT release in the rat hypothalamus. Pharmacol.Biochem.Behav., 59, 179-182.

Wechsler, J.G. (1998). Drug therapy of obesity. Acta med.Austriaca, 25, 138-141.

Weck, M., Fischer, S. (1997). Ätiologie der Adipositas. Der Internist, 38, 204-213.

Winsauer, P.J., Verrees, J.F., O'Halloran, K.P., Bixler, M.A., Mele, P.C. (1994). Effects of chlordiazepoxide, 8-OH-DPAT and ondansetron on radiation-induced decreases in food intake in rats. J.Pharmacol.Exp.Ther., 270, 142-149.

Wirth, A. (1998). Adipositas-Fibel. Springer. Berlin.

Yocca, F.D., Iben, L., Meller, E. (1992). Lack of apparent receptor reserve at postsynaptic 5-hydroxytryptamine1A receptors negatively coupled to adenylyl cyclase activity in rat hippocampal membranes. Mol.Pharmacol., 41, 1066-1072.

Zemishlany, Z., Modia, I., Apter, A. Jerushalmy, Z., Samuel, E., Tyano, S. (1987). Serotonin (5-HT) uptake by blood platelets in anorexia nervosa. Acta Psychiatr.Scand., 75, 127-130.

Zhou, D., Huether, G., Wiltfang, J., Hajak, G., Ruther, E. (1996). Serotonin transporters in the rat frontal cortex: lack of circadian rhythmicity but down-regulation by food restriction. J.Neurochem., 67, 656-661.

Zippel, U., Heidel, E., Davidowa, H. (1999). Action of cholecystokinin and serotonin on lateral hypothalamic neurons of rats. Eur.J.Pharmacol., 379, 135-140.

Zucker, L.M. (1972). Fat mobilization in vitro and in vivo in the genetically obese Zucker rat „fatty“. J.Lipid.Res., 13, 234-243.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, in Teilen keine Kopie anderer Arbeit darstellt und die benutzen Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Frederike Bianca Kienzle

Danksagung

Mit der vorliegenden Promotionsarbeit habe ich wertvolle Erfahrungen im wissenschaftlichen Arbeiten und Schreiben gesammelt. Ich danke allen Mitarbeitern und Freunden ganz herzlich für ihre Unterstützung.

Folgenden Personen gebührt mein besonderer Dank:

Frau Prof. Dr. Heidrun Fink

Herrn Dr. Jörg-Peter Voigt

Frau Dr. M. Voits, Herrn Dr. R. Sohr, Herrn Dr. A. Rex,

Frau Tanneberger, Frau Hartmann, Frau Sprang

und allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin,

meinen Eltern Margrit und Helmut Kienzle

sowie meinen Geschwistern Charlotte, Florian und Clemens-Valentin

und

Miguel Angel Martinez Garza.

Curriculum Vitae

Name: Frederike Bianca Kienzle

Anschrift: frederike.kienzle@gmx.net

Geburtstag: 17.01.1972

Schule und Studium

1982-91 Georg-Büchner-Gymnasium Rheinfelden

1991-92 Propädeutisches Studium Generale am Leibniz Kolleg, Tübingen

1992-99 Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität Berlin

Beruflicher Werdegang

1998 Gastroenterologie/Kardiologie, Gemeinschaftskrankenhaus Havelhöhe

1999 Chirurgie, Regionalspital Rheinfelden (CH)

Pädiatrie, Charité Berlin

Neonatologie, Hospital del Mar, Barcelona (E)

2000-01 Klinik für Psychiatrie und Neurologie des Kinder- und Jugendalters, Krankenhaus. Reinickendorf, Berlin

2001-02 Pädiatrische Endokrinologie/Allgemeine Pädiatrie, Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Universität Freiburg

Wissenschaftliche Tätigkeiten

1995 „Neurobiology and Behaviour“, Tlaxcala (MX)

International Congress for medical students, Katovice (PL)

V. Europäischer Studentenkongress der Charité, Berlin

1996 Forum of European Neuroscience (ENA), Berlin

“Transgenetics and mouse models in psychopharmacology”, Charité Berlin

1997 “New developments in pharmacology of appetite”, Charité Berlin

1998 “Psychopharmakologie im Kindes- und Jugendalter”, Lübben

2001 „Investigator support initiative“, ZKS Heidelberg

2002 „Symposium Wachstumshormon“, Davos (CH)

„Molekulargenetische Diagnostik in der Endokrinologie“, Heidelberg

„Pediatric Endocrinology“, Kloster Irsee

Kongress deutscher Kinderärzte, Leipzig

Kongress „European Society of Pediatric Endocrinology“, Madrid (E)

Publikationen

Kienzle, F., Hoffmann, M.M., Kaltenbacher, D., Weeber, M., März, W., Schwab, K.O. (2002): Familiärer Lipoproteinlipasemangel: Effekt einer Diätberatung im heimischen Umfeld. Kinder- und Jugendmedizin: A 88.

Schwab, K.O., Kannan, C.V., Kienzle, F., Moser, I., Jobst, G., Urban, G. (2002): Klinische Mikrodialyse: Anwendungen in der Endokrinologie, Diabetologie und bei angeborenen Stoffwechselerkrankungen. Kinder- und Jugendmedizin: A 33.

Voigt, J.P., Kienzle, F., Sohr, R., Rex, A., Fink, H. (2000): Feeding and 8-OH-DPAT-related release of serotonin in the rat lateral hypothalamus. Pharmacol.Biochem.Behav., 65, 183-189.

Voigt, J.P., Nwaiser, B., Sohr, R., Kienzle, F., Fink, H. (1999): Effect of 5-HT_{1A} receptor activation on hypothalamic glucose to Serotonin and food intake in rat. Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes: A 17.

Kienzle, F., Voigt, J.P., Sohr, R., Fink, H. (1998): Effect of 5-HT_{1A} receptor stimulation on 5-HT release in the LHA and relation to food intake in rat: an in vivo microdialysis study. Europ.J. Neuroscience: A 10.