

Aus der Medizinischen Klinik I  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Horst Lorenz Fehm

---

**Atriales Natriuretisches Peptid (ANP)**  
**hemmt die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse**  
**nach intranasaler Applikation bei gesunden Männern**

---

Inauguraldissertation

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von  
Birte Behn  
aus Düsseldorf

Lübeck 2005

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Boris Perras
2. Berichtstatter: Prof. em. Dr. med. Dr. h. c. Wolfgang Kühnel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.08.2005  
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 19.08.2005

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	4
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1 Allgemeine Einführung und klinische Bedeutung.....	5
1.2 Physiologie der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse .....	7
1.3 Hormone der HHN-Achse.....	9
1.3.1 Corticotropin-Releasing Hormon .....	9
1.3.2 Adrenocorticotropes Hormon.....	10
1.3.3 Cortisol .....	10
1.3.4 Vasopressin.....	11
1.4 Atriales Natriuretisches Peptid.....	12
1.5 Der Einfluss von ANP auf die HHN-Achse.....	14
1.6 Fragestellung.....	17
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1 Probanden .....	18
2.2 Versuchsaufbau.....	18
2.3 Versuchsablauf.....	19
2.4 Testsubstanz – ANP.....	23
2.5 Chemische Untersuchungsmethoden.....	23
2.5.1 ACTH.....	23
2.5.2 Cortisol .....	24
2.5.3 Vasopressin.....	25
2.5.4 Atriales natriuretisches Peptid .....	25

2.6	Statistische Auswertung .....	26
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
3.1	ANP-Plasmaspiegel.....	27
3.2	Effekte von ANP auf die HHN-Achse nach Stimulation durch den Insulin-Hypoglykämie-Test .....	29
3.3	Effekte von ANP auf die HHN-Achse nach Stimulation durch den CRH/VP-Test.....	32
3.4	Wirkung von ANP auf Parameter des Wasserhaushalts, Blutdruck und Herzfrequenz .....	35
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>37</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>43</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>53</b>
	Danksagung .....	53
	Lebenslauf .....	54

**Abkürzungsverzeichnis**

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ANF	Atrialer natriuretischer Faktor
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
AUC	Area Under Curve (Fläche unter der Kurve)
BNP	Brain natriuretic peptid
CAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CNP	C-type natriuretisches Peptid
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CRIF	Corticotropin-release-inhibiting factor
EEG	Elektroenzephalogramm
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse
IHT	Insulin-Hypoglykämie-Test
MW	Mittelwert
NaCl	physiologische Natriumchloridlösung
PGE	Prostaglandin E
PGF	Prostaglandin F
RIA	Radioimmunoassay
SEM	Standard Error of Means (Standardfehler)
VP	Vasopressin
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

### 1.1 Allgemeine Einführung und klinische Bedeutung der Thematik

Das Atriale Natriuretische Peptid (ANP) ist ein Peptid, das neben seinem Hauptbildungsort, dem Herzvorhof, auch im Gehirn nachgewiesen werden konnte (Gutkowska et al. 1997). Es greift sowohl zentral als auch peripher in die Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts ein (s. 1.3). Im Tierversuch und beim Menschen wurden ANP eine verstärkte Diurese, Natriurese und vasodilatatorische Eigenschaften zugeschrieben (Levin et al. 1998). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine inhibitorische Wirkung von ANP auf die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse (HHN-Achse) (Engler et al. 1999, Jessop 1999).

Die HHN-Achse steuert über die Ausschüttung von Cortisol die Reaktion des Körpers auf innere und äußere Stressoren. Ihre Aktivität steht in engem Zusammenhang mit dem Immunsystem und unserer psychischen Befindlichkeit. Die Aufgabe der HHN-Achse ist es, diese elementaren Funktionen des Körpers auch in Anwesenheit diverser Störfaktoren aufrechtzuerhalten.

Unter akutem Stress lässt sich ein schneller Anstieg und ein darauffolgender Abfall der Aktivität der HHN-Achse auf das Ausgangsniveau verzeichnen (Sapolsky 1999, Pacak et al. 2000). Dieser kurzzeitige Anstieg entspricht der physiologischen Stressreaktion. Die Plasmakonzentration von Cortisol und ACTH steigt (Sapolsky 1999, Pacak et al. 2000). Das Immunsystem des Körpers wird in eine erhöhte Abwehrbereitschaft versetzt, Aufmerksamkeit und Kurzzeitgedächtnis verbessert (Sapolsky 1999, McEwen 2000).

Unter chronischem Stress kommt es hingegen zu einem dauerhaften pathologischen Anstieg der basalen Aktivität der HHN-Achse, der mit strukturellen und funktionellen Umbauten im Gehirn, verminderter Widerstandskraft der

Neurone gegenüber Noxen und der Atrophie von Dendriten einhergeht (Sapolsky 1999). Die Immunabwehr wird geschwächt (McEwen 2000).

Eine pathologische Sekretion von Cortisol existiert nicht nur bei seltenen Krankheiten wie dem Cushing-Syndrom. Sie konnte in den vergangenen Jahren auch mit weitverbreiteten Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Adipositas, Hypertonie, Depressionen, Posttraumatischen Belastungsstörungen und anderen psychiatrischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Lupien et al. 1999, McEwen 2000, Bjorntorp 2001, Weber-Hamann et al. 2002, Yehuda 2002, McEwen 2003, Rosmond 2003). Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten altersbedingter Erkrankungen und einem chronisch erhöhten Cortisolspiegel wurde mehrfach vermutet (Seeman und Robbins 1994, Sapolsky 1999). Möglicherweise besteht in diesem Fall ein kumulativer Effekt der Stressfaktoren über die gesamte Lebenszeit (*allostatic load*) (Seeman und Robbins 1994, Sapolsky 1999, Seeman et al. 2001, McEwen 2003). Es ist wahrscheinlich, dass im Senium die Reduktion von Corticosteroidrezeptoren im Hypothalamus zu einer Verminderung der negativen Rückkopplung (*negative feedback*) und folglich zu chronisch erhöhten Cortisolspiegeln führt. Aus diesen Gründen ist die Kontrolle der Aktivität der HHN-Achse und ihre mögliche Hemmung von großem klinischem Interesse.

Die Rolle des ANP wurde in diesem Zusammenhang bereits mehrfach diskutiert (Gutkowska et al. 1997, Levin et al. 1998, Jessop 1999). Aus in-vitro- und Tierversuchen ist es als potentieller Inhibitor der hypothalamischen CRH-Ausschüttung bekannt. Probandenstudien kommen bislang zu widersprüchlichen Ergebnissen.

Die vorliegende Studie untersucht, ob eine Hemmung der stimulierten HHN-Achse beim Menschen durch intranasal verabreichtes ANP möglich ist und auf welcher Ebene diese Hemmung wirksam wird. Hierzu wurde ANP als Nasenspray appliziert. Diese Form der Applikation wurde aufgrund der Vermutung gewählt, dass sie einerseits eine direkte Wirkung des ANP im Gehirn unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke ermöglicht. Andererseits sollen systemische Nebenwirkungen, die den inhibitorischen Effekt möglicherweise maskieren könnten, minimiert werden. Man vermutet, dass ANP ähnlich wie andere Peptide die Blut-Hirn-

Schranke nur in geringem Maße passieren kann und dass eine zentrale Wirksamkeit nur bei sehr hoher Dosierung zu beobachten ist (Levin et al. 1998). Für die intranasale Applikation der Neuropeptide Vasopressin, Insulin und ACTH konnte eine effektive Wirkung bei deutlicher Verminderung systemischer Nebenwirkungen nachgewiesen werden (Fehm et al. 2000, Born et al. 2002). Eine Inhibition der basalen Aktivität der HHN-Achse konnte bislang nicht sicher beschrieben werden, daher wurden die Versuche an der stimulierten HHN-Achse durchgeführt. Von zwei Probandengruppen wurde die erste mittels Insulin-induzierter Hypoglykämie, die einen Stimulationsreiz auf hypothalamischer Ebene setzt, stimuliert. In der zweiten Gruppe wurde CRH/VP als bekannter hypophysärer Sekretionsreiz verwendet (Späth-Schwalbe et al. 1987, Yang et al. 1999). Eine Differenzierung des inhibitorischen Effekts zwischen zentralen und hypophysären Strukturen wurde hiermit ermöglicht.

## **1.2 Physiologie der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse**

Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere bilden gemeinsam die Hauptbestandteile eines neuroendokrinen Regelkreises. Diese einzelnen Bestandteile sind hierarchisch hintereinandergeschaltet und regulieren ihre Aktivität durch ein negatives Feedback. Der Hypothalamus empfängt Signale von höheren Rindenregionen, vom Hirnstamm direkt oder über den Hippocampus. Als Antwort auf diese Signale werden hypophyseotrope Hormone, wie zum Beispiel das corticotrope Releasinghormon (CRH) aus den paraventriculären Kernen des Hypothalamus, ausgeschüttet (Levin et al. 1998). Sie regulieren die Freisetzung von Hypophysenhormonen, im Fall des CRH die Freisetzung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH). ACTH seinerseits stimuliert die Nebennierenrinde und führt zur Sekretion von Cortisol aus der Zona fasciculata der Nebennierenrinde. Der steigende Cortisolplasmaspiegel hemmt in Form eines negativen Feedback-Mechanismus die Aktivität der Hypophyse und des



Hypothalamus und inhibiert die Ausschüttung von ACTH und CRH. Die wichtigsten Aufgaben dieses Regelkreises sind die endogen gesteuerte basale Aktivität einerseits und die endogen oder exogen provozierte Antwort auf Stressoren andererseits. Neben der basalen Aktivität unterscheidet man die Funktion im akuten Stresszustand und die Funktion unter chronischem Stress. Das basale Sekretionsmuster bezeichnet die Ausgangsaktivität in Abwesenheit jeglicher Stressoren. Es unterliegt einem circadianen Rhythmus, in dem sich Sekretions- und Ruhephasen abwechseln. Die Sekretionsphasen betragen nur ein Viertel der Gesamtzeit, insgesamt sechs Stunden innerhalb von 24 Stunden (Weitzmann et al. 1971). Die übrigen 18 Stunden sind Ruhephasen des Systems. Eine Sekretionsphase ist gekennzeichnet durch den steilen Anstieg der Plasmahormonspiegel und einen langsameren exponentiellen Abfall in der nachfolgenden Ruhephase. Die Höhe der Plasmahormonspiegel ist demzufolge abhängig von Frequenz und Amplitude der sekretorischen Episoden. Die sekretorische Aktivität der HHN-Achse unterliegt einem ausgeprägten Tag-Nacht-Rhythmus. Zu Beginn der Schlafphase während des Slow-wave-Schlafes wird die Aktivität der HHN-Achse gehemmt, und es kommt neben dem Abfall der Cortisolkonzentration zu einer gesteigerten GH-Sekretion und einer Zunahme der langsamen Wellen im EEG (Späth-Schwalbe et al. 1994, Friess et al. 1995, Bierwolf et al. 1997, Wiedemann et al. 2000). CRH reguliert -in Abwesenheit anderer Stressoren- den Grad der Wachheit (Chang und Opp 2001, Steiger 2002). Eine Veränderung des Sekretionsmusters beobachtet man unter Stress. Der Begriff Stress wurde 1946 erstmals von Hans Selye als eine unspezifische Reaktion des Körpers auf eine von außen kommende Belastung, die das physiologische Gleichgewicht stört, definiert. Er bezeichnete die von der Nebennierenrinde ausgeschütteten Glucocorticoide als wichtigsten hormonellen Marker. Schon damals erkannte er, dass es zu Fehlfunktionen des Organismus kommt, wenn der Körper versucht, sich kontinuierlich an starken Stress anzupassen. Die Dauer und die Intensität des Stressreizes sind folglich von entscheidender Bedeutung für das Ausmaß der Stressreaktion. Eine Stimulation der HHN-Achse unter Versuchsbedingungen ist auf verschiedene Arten möglich. Die in den bisherigen Studien verwendete Stimulation mittels

CRH/VP setzt einen hypophysären Sekretionsreiz, der über corticotrope Rezeptoren die Ausschüttung von ACTH erhöht (Holsboer et al. 1987). VP potenziert diese Wirkung (Gillies et al. 1982, Späth-Schwalbe et al. 1987, Salata et al. 1988). Ein Einfluss auf zentrale Strukturen kann nicht beurteilt werden. Der Insulin-Hypoglykämie-Test kann alternativ verwendet werden, da seine Wirkung hypothalamisch vermittelt wird. Insbesondere im ventromedialen Hypothalamus wurden Neurone identifiziert, die ähnlich den pankreatischen  $\beta$ -Zellen Glukosesensoren besitzen und über ihren Aktivitätsgrad auf den Blutglukosespiegel reagieren (Yang et al. 1999). Hypothalamische Neurone werden demzufolge durch eine Hypoglykämie zu vermehrter endokriner Aktivität angeregt. Da die beschriebenen Glukosesensoren ausschließlich in diesem Areal vorkommen, ist die folgende Aktivierung der gesamten HHN-Achse eindeutig dieser Region zuzuschreiben. Der Grad der Unterzuckerung steht jedoch nicht im Zusammenhang mit dem Grad der Aktivität (Nye et al. 2001). Eine potentielle inhibitorische Wirkung auf die HHN-Achse lässt sich bis auf hypothalamische Ebene zurückverfolgen. Eine Aussage über die Wirkung auf dem Hypothalamus übergeordnete Strukturen kann nicht getroffen werden.

### **1.3 Hormone der HHN-Achse**

#### **1.3.1 Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH)**

CRH ist ein aus 41 Aminosäuren bestehendes, artspezifisches Peptid, das 1981 erstmals von Vale et. al isoliert werden konnte. Es wird in den paraventriculären Kernen des Hypothalamus gebildet und bewirkt als Mediator der endokrinen, autonomen und immunen Stressreaktion an der Hypophyse die Ausschüttung von ACTH und  $\beta$ -Endorphinen. Die Sekretion wird über Stimulation der Adenylatzyklase ausgelöst (Behan et al. 1995, Levin et al. 1998). Vasopressin

potenziert die CRH-Wirkung auf die ACTH-Freisetzung (Gillies et al. 1982, Späth-Schwalbe et al. 1987, Salata et al. 1988). Im Plasma liegt CRH normalerweise gebunden an ein CRH-Bindungsprotein vor, dessen Regulation an der Modulation der Stress-Antwort beteiligt ist (Behan et al. 1995). Durch Acetylcholin, Epinephrin, Histamin, PGF<sub>2a</sub> und PGE wird die CRH-Sekretion gefördert (Martin 1985). Melatonin, Norepinephrin sowie ACTH und Glucocorticoide hemmen die CRH-Sekretion über einen negativen Feedbackmechanismus (Engler et al. 1999).

### **1.3.2 Adrenocorticotropes Hormon (ACTH)**

ACTH ist ein einkettiges Peptidhormon, dessen biologische Wirksamkeit vor allem auf seinem N-terminalen Anteil beruht. Biologische Wirkungen von ACTH sind die Steigerung der Corticosteroidsynthese und –sekretion sowie die Erhöhung der Nebennierendurchblutung und –größe. Der wichtigste Releasing-Faktor für ACTH ist CRH. Daneben führen auch Vasopressin, Oxytocin, Cholezystokinin und Adrenalin zur Ausschüttung von ACTH (Axelrod und Reisine et al. 1984, Späth-Schwalbe et al. 1988, Antoni und Dayanithi et al. 1989). ACTH erreicht die Nebenniere auf dem Blutweg.

### **1.3.3 Cortisol**

Cortisol ist ein Steroidhormon, dass in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde gebildet wird. Seine Sekretion wird über die obengenannten Hormone CRH und ACTH gesteuert und unterliegt wie die gesamte HHN-Achse einem circadianen Rhythmus mit einem Tief in der ersten Nachthälfte und einem Konzentrationsmaximum in den frühen Morgenstunden (Brandenberger et al.

1984). Der Serumcortisolspiegel wird zusätzlich durch zahlreiche endogene und exogene Faktoren beeinflusst. Hypoglykämie, körperliche Anstrengung, psychische Belastung und ein veränderter Tag-Nacht-Rhythmus sind nur einige dieser Faktoren (Brandenberger et al. 1984). Die Hauptwirkung von Cortisol besteht entsprechend seiner Rolle als Mediator der Stressreaktion in der Bereitstellung von Energie in Form von Glukose und Fettsäuren. Fehlende Hemmung oder überschießende Sekretion von Cortisol kann u.a. zu Osteoporose, Hypertonie und psychischen Veränderungen, zu Veränderungen des Blutbildes mit Leukozytose und zu Bindegewebsverlust infolge verminderter Fibroblastenaktivität führen.

#### **1.3.4 Vasopressin (VP)**

Vasopressin ist ein Nonapeptid mit antidiuretischer und geringer vasokonstriktiver Wirkung. Es wird auch als Antidiuretisches Hormon (ADH) bezeichnet. VP wird im Hypothalamus synthetisiert, gelangt über axonalen Transport in die Neurohypophyse, wird dort gespeichert und als Antwort auf den entsprechenden Reiz ausgeschüttet. Sekretionsreiz ist die Erhöhung der Osmolarität im peripheren Blut, die über Osmorezeptoren vermittelt wird (Robertson 1986). In der Niere steigert VP die Wasserrückresorption durch eine erhöhte Durchlässigkeit des distalen Tubulus für Wasser. In hohen Konzentrationen wirkt Vasopressin außerdem vasokonstriktorisch (Cunningham und Sawchenko 1991). Durch diese Mechanismen wird die Osmolarität gesenkt und der Blutdruck erhöht. Neben der Osmolarität wird die Sekretion aber noch von weiteren Faktoren beeinflusst. So führen z.B. ein Blutdruckabfall, Übelkeit und Bewegungserkrankungen (Kinetosen), Hypo- oder Hyperglykämie, Angiotensin und zahlreiche Medikamente zu erhöhten Vasopressinspiegeln. Blutdruckerhöhung und Alkohol dagegen hemmen die VP-Ausschüttung (Robertson 1977 und 1986). Die Auswirkungen von unspezifischem Stress auf den Vasopressinspiegel sind nicht ausreichend

belegt. Synergistisch mit CRH wirkt VP an corticotropen Zellen der Adenohypophyse stimulierend auf die Sekretion von ACTH (Späth-Schwalbe et al. 1987, Salata et al. 1988, Bierwolf et al. 1997).

#### **1.4 Atriales natriuretisches Peptid (ANP)**

Das Atriale Natriuretische Peptid bildet zusammen mit BNP (brain natriuretic peptid) und CNP (c-type natriuretic peptid) die Gruppe der natriuretischen Hormone. Seit längerem ist bekannt, dass ANP vor allem in den Myozyten des Herzvorhofs gebildet wird, in kleineren Mengen aber auch in Zellen der renalen Sammelrohre (Wiedemann et al. 2000). Außerdem konnten sowohl das Peptid selbst als auch ANP-Rezeptoren in verschiedenen Anteilen des Gehirns nachgewiesen werden, hier insbesondere im Hypothalamus, im Septum, Mittelhirn, Cortex und Bulbus olfactorius (Tanaka et al. 1984). Neuere Studien belegen, dass das ANP-Gen in verschiedenen Geweben exprimiert wird, so dass davon auszugehen ist, dass es nicht nur von den oben genannten Strukturen, sondern von unterschiedlichsten Geweben produziert und sezerniert wird (Engler et al. 1999). ANP ist ein Peptid aus 28 Aminosäuren, das als Prä-Pro-Hormon (151 Aminosäuren) gebildet, als Pro-ANP (126 Aminosäuren) in Sekretgranula gespeichert und auf ein spezifisches Signal hin sezerniert wird (de Bold 1981, Arendt und Gerbes 1986, Gutkowska und Nemer 1989, Inagami 1989, Weidmann et al. 1989). Der wirksamste Reiz für die ANP-Sekretion ist eine vermehrte Vorhofdehnung. Neuronale, endokrine oder lokale Vasokonstriktion bzw. die erhöhte Serumkonzentration von Arginin-Vasopressin, Endothelin und Katecholaminen stellen ebenfalls einen Sekretionsreiz dar (Weidmann et al. 1989, Huang et al. 1992, Levin et al. 1998). Eine hochdosierte Verabreichung von Glukokortikoiden und Mineralkortikoiden stimuliert die Freisetzung von ANP aus Kardiomyozyten, hemmt jedoch die Freisetzung aus dem Hypothalamus (Levin et al. 1998, Weidmann et al. 1989). Der durchschnittliche ANP-Plasmaspiegel liegt

beim Erwachsenen in dem Bereich von 2-80 pmol/l. ANP wirkt unter physiologischen Bedingungen über verschiedene Mechanismen vasodilatatorisch und unterstützt die renovaskuläre und kardiovaskuläre Homöostase. Es ist an der Aufrechterhaltung des inneren Milieus des Körpers, insbesondere an der Kreislaufregulation unter möglichst konstantem Elektrolyt- und Säure-Base-Haushalt, beteiligt. An der Niere wirkt ANP über zwei verschiedene Mechanismen natriuretisch und diuretisch. Es bewirkt eine Vasodilatation am Vas afferens und Vasokonstriktion am Vas efferens und erhöht so die Filtrationsrate. An den Mesangiumzellen vergrößert es über eine Relaxation dieser Zellen die effektive Filtrationsfläche. Vermutlich besitzt ANP darüber hinaus eine direkte tubuläre Wirkung. Durch diese Mechanismen steigert das Peptid die Diurese, senkt den Blutdruck und die Herzfrequenz (Levin et al. 1998). In geringem Ausmaß stimuliert ANP die renale Ausscheidung von Kalium, Calcium, Magnesium und Phosphat (Richards und Nicholls 1985, Weidmann und Hasler 1986). Über eine periphere Gefäßdilatation und eine Hemmung der Reninsekretion aus juxtaglomerulären Zellen wird die arterielle Blutdrucksenkung verstärkt (Kurtz und Della Bruna 1986). Zusätzlich hemmt ANP direkt die Aldosteron-Ausschüttung aus der Nebennierenrinde (Fujio et al. 1986, Cuneo et al. 1987). Über die zentrale Wirkung von ANP ist weit weniger bekannt. Im Gehirn hemmt es unter Stress die CRH- und VP-Sekretion aus dem Hypothalamus und senkt so die Stressinduzierte Freisetzung von ACTH (Franci et al. 1992). Zentral wird zudem der Durst und der Hunger auf Salz vermindert. Nahezu alle zentralen und peripheren Wirkungen von ANP werden über eine Aktivierung der Guanylcyclase vermittelt (Abou-Samra et al. 1987, Antoni und Dayanithi 1989 und 1990). Seine Effekte greifen an den verschiedenen Organsystemen des Körpers synergistisch in die Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolytstoffwechsels ein (s. Abb.1) und vermindern den wichtigen Sekretionsreiz der Vorhofdehnung. Im höheren Alter, bei Erkrankungen mit erhöhtem Füllungsdruck der Vorhöfe wie z. B. Herzklappenvitien oder konstant vermehrtem intravasalem Volumen bei Herz- oder Niereninsuffizienz ist der ANP-Plasmaspiegel chronisch erhöht (Arendt und Gerbes 1986, Nakamura und Ichikawa 1988).

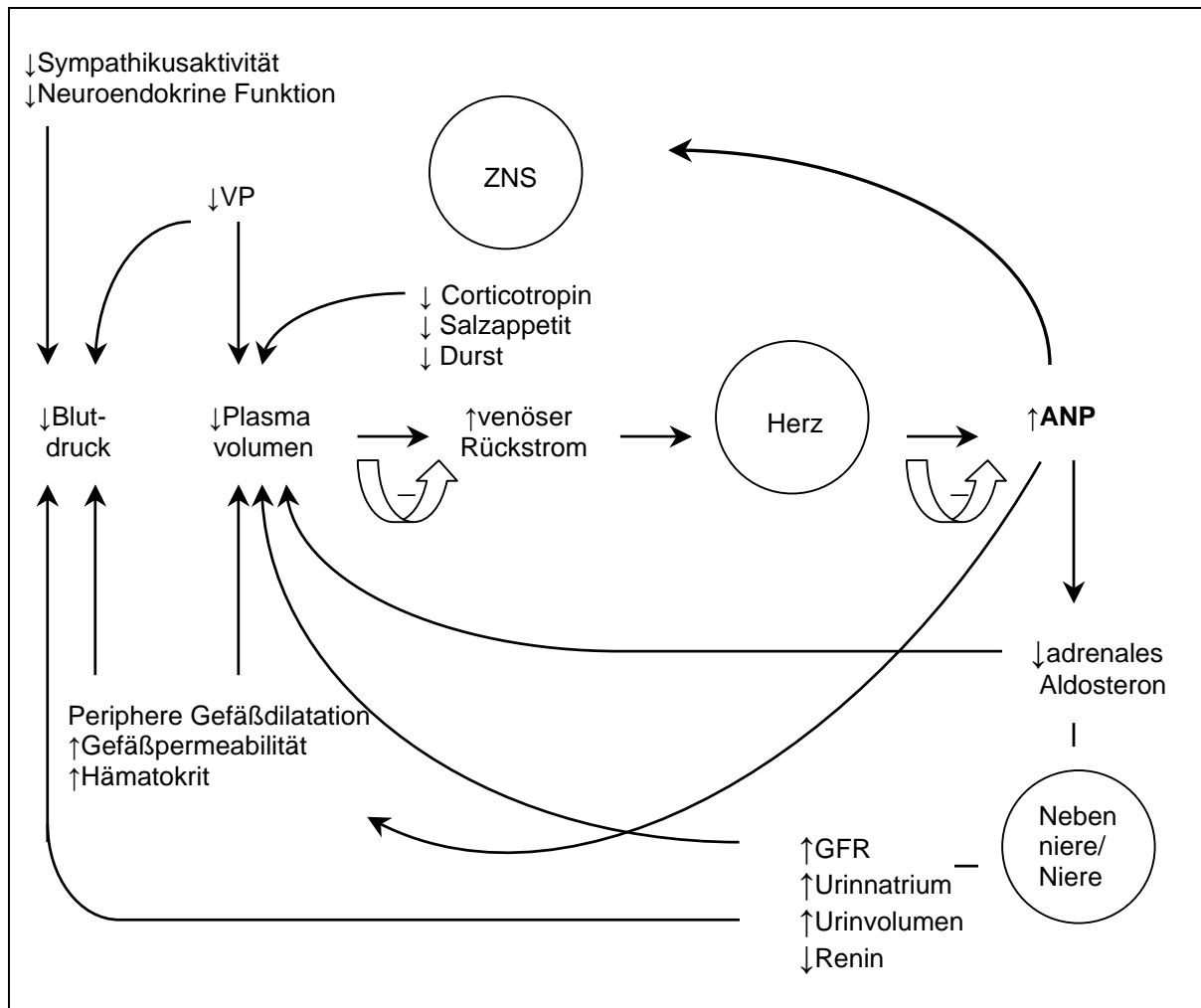


Abb. 1: Physiologische Effekte von ANP nach kardialer Sekretion (modifiziert nach Levin et al., *Mechanisms of Disease, The New England Journal of Medicine*, Vol. 339, No. 5)

### 1.5 Der Einfluß von ANP auf die HHN-Achse

Die HHN-Achse bildet eine zentrale Steuerungseinheit für endokrine Prozesse in Ruhe und unter Stress. Sie steht einerseits in Verbindung mit übergeordneten zentralen Strukturen, andererseits wird sie von verschiedenen Botenstoffen des Körpers beeinflusst (s. 1.2). Eine mögliche Einflussnahme auf ihre Aktivität ist von

großem wissenschaftlichem und klinischem Interesse, weil die erhöhte sekretorische Aktivität der HHN-Achse ein herausragendes Merkmal von diversen psychiatrischen und internistischen Erkrankungen ist (Lupien et al. 1999, McEwen 2000, Bjorntorp 2001, Weber-Hamann et al. 2002, Yehuda 2002, McEwen 2003, Rosmond 2003). In Tierversuchen, in-vitro-Studien und Probandenstudien wurden in den letzten Jahren verschiedene mögliche Inhibitoren der HHN-Achse getestet, darunter GHRH, Dopamin und MSH (Engler et al. 1999, Jessop 1999). Auch das Atriale Natriuretische Peptid wurde in diesem Zusammenhang immer wieder erwähnt (Gutkowska et al. 1997, Levin et al. 1998, Jessop 1999). So hemmt ANP die Freisetzung von CRH, ACTH und Prolaktin sowohl in vitro als auch in vivo und nimmt vermutlich auf diese Weise Einfluss auf die Reaktion auf physischen und psychischen Stress (Antoni und Dayanithi 1990, Ibanez-Santos 1990, Fink et al. 1991, Franci et al. 1992). Probandenstudien waren diesbezüglich bislang nicht eindeutig. Morgens verabreichtes ANP konnte weder den CRH-vermittelten ACTH- und Cortisol-Anstieg noch die ACTH-vermittelte Cortisol-Sekretion hemmen (Ur et al. 1991). Ein inhibitorischer Einfluss auf die basale Funktion der HHN-Achse ist nicht belegt. Nach einer CRH-Infusion als Sekretionsreiz konnte mittels einer ANP-Infusion am Abend ein hemmender Effekt erzielt werden (Kellner et al. 1992). Weitere Studien gaben Hinweise, dass ANP die CRH-stimulierte ACTH- und Prolaktinsekretion blockierte und in der Folge zu verminderten Cortisol- und Vasopressinplasmaspiegeln führte (Kellner et al. 1995, Bierwolf et al. 1997 und 1998). Die vorangegangenen Studien lassen den Schluss zu, dass eine inhibitorische Wirkung von ANP auf die HHN-Achse existiert. Vermutlich wird durch ANP die Ansprechbarkeit des Systems auf Substanzen, die die ACTH-Ausschüttung stimulieren, vermindert. Der Mechanismus dieser Inhibition bleibt weitestgehend unbekannt. In den bisherigen Probandenstudien wurde ANP in der Regel i.v. appliziert. Die Blut-Hirn-Schranke ist aber relativ undurchlässig für ANP (Ermisch et al. 1991, Levin et al. 1998). Im Tierversuch konnten spezifische ANP-Rezeptoren im Endothel, im Plexus choroidealis sowie in den cerebralen Gefäßen einschließlich des kapillären Systems nachgewiesen werden (Bianchi et al. 1986). Über die Funktion dieser Rezeptoren ist wenig bekannt. Theoretisch lässt sich eine rezeptorvermittelte Endocytose zum



Transport des Peptids über die Blut-Hirnschranke genauso wie eine Signaltransduktion ausgehend von den Rezeptoren vermuten (Ermisch et al. 1991). Auch die Hypophyse exprimiert ANP-Rezeptoren und könnte möglicherweise über eine verminderte Proopiomelanocortin-Synthese auf ANP reagieren (Mantyh et al. 1987, Foresta et al. 1988, Tan et al. 1994). Eine direkte Wirkung des ANP an der Hypophyse konnte bislang nicht belegt werden. Eine intracerebrale Wirkung über den Hypothalamus ist jedoch bekannt. Deshalb wurde in der vorliegenden Studie das Peptid intranasal verabreicht. Für die Peptide ACTH, Vasopressin und Insulin ist belegt, dass sie intranasal verabreicht, innerhalb von 30 Minuten im Liquor nachweisbar sind, ohne systemische Nebenwirkungen zu verursachen, und dass die Wirkung der so verabreichten Teststoffe deutlich länger anhält als nach i.v. Gabe (Pietrowsky et al. 1996, Born et al. 2002).

## 1.6 Fragestellung

Im Tierversuch und weniger konsistent auch im Humanversuch hemmt ANP die HHN-Achse auf zentralnervöser Ebene. Bislang wurde die ANP-Wirkung am Menschen nur nach i.v.-Applikation untersucht, wobei unklar blieb, welcher Anteil der Testsubstanz tatsächlich das Gehirn erreichte. Zudem wurden die Effekte durch Wirkungen der Testsubstanz auf Wasserhaushalt und Kreislauf maskiert. Deshalb sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

1. Hemmt Atriales Natriuretisches Peptid nach intranasaler Applikation die Hypothalamus-Hypophysen-Achse bei gesunden jungen Männern?
2. Wird die Hemmung auf Ebene des Hypothalamus oder der Hypophyse wirksam?
3. Beeinflusst intranasal verabreichtes ANP den Wasserhaushalt und den Kreislauf?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Probanden**

An den Versuchen nahmen 21 gesunde Männer im Alter zwischen 23 und 30 Jahren teil. Sowohl physische als auch psychische Erkrankungen wurden im Vorfeld ausgeschlossen. Die Probanden waren Nichtraucher, deren body mass index und Blutdruck im Normbereich lagen. Sie nahmen zum Zeitpunkt der Versuche keine Medikamente ein und wurden gebeten, in den Tagen vor Versuchsbeginn einen regelmäßigen Tag-Nacht-Rhythmus einzuhalten. Außerdem wurden sie angehalten, in den vier Stunden vor Beginn der Untersuchung nicht mehr zu essen und keinen Kaffee mehr zu trinken. Alle Versuchspersonen wurden persönlich und anhand eines Merkblattes über den Ablauf der Studie und mögliche Nebenwirkungen der verabreichten Medikamente aufgeklärt und erteilten ihr Einverständnis schriftlich. Die örtliche Ethikkommission äußerte gegen die Studie keine Bedenken. Sie genehmigte den Antrag mit dem Aktenzeichen 01-024.

### **2.2 Versuchsaufbau**

Der Versuch wurde nach einem doppel-blinden crossover-design aufgebaut. Jeder der 21 Probanden nahm an zwei Versuchen teil. Von den 21 Probanden wurden zwölf mittels IHT, neun mittels CRH/VP behandelt. Die Versuchsergebnisse wurden jeweils einer Placebobedingung gegenübergestellt. Bei gleichbleibender Stimulationsmethode wurde nach dem Doppel-Blind-Prinzip an einem der

Versuchstage die Testsubstanz (ANP), am anderen Tag Placebo (physiologische Kochsalzlösung) intranasal verabreicht. Die Stimulation der HHN-Achse erfolgte entweder durch den Insulin-Hypoglykämie-Test oder durch die Gabe von CRH/VP. Zwischen den zwei Untersuchungstagen lag ein Zeitraum von mindestens sieben Tagen. Die Versuche begannen jeweils um 11.45 Uhr und endeten um 14.30 Uhr.

### 2.3 Versuchsablauf

Die Versuche fanden jeweils mittags ab 11.45 Uhr im Schlaflabor der Klinik für Innere Medizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck statt.

Jeder Studientag begann für den jeweiligen Probanden mit einer Urinabgabe, deren Volumen und Osmolalität bestimmt wurden. Dann wurde in die Cubitalvenen beidseits je ein venöser Zugang (Venflon R2, 1,2 mm, Fa. BOC Ohmeda AB) gelegt. Einer der Zugänge diente den regelmäßigen Blutentnahmen. Zur Vermeidung der Blutgerinnung im System wurde eine Infusionslösung (NaCl 0,9%, 0,5l, Fa. Berlin Chemie AG) verwendet. Für die Blutentnahmen wurden zwei Dreiwege-Hähne (Discofix bzw. Discofix –3, Fa. B. Braun Melsungen AG) zwischen den Zugang und das Infusionsbesteck (R87V, Fa. BD Infusion Therapy GmbH) geschaltet. Der zweite Zugang diente nach IHT der Verabreichung der Glukoselösung (Glukose 10 %, 0,5l, Delta Pharma, Boehringer) zur Beendigung der Insulin-induzierten Hypoglykämie. Zur Bestimmung des Blutdrucks wurde ein automatisches Blutdruckmessgerät (boso-medicus, Fa. Bosch & Sohn GmbH) verwendet. Nach den abgeschlossenen Vorbereitungen begann der Proband um 12.00 h zum Zeitpunkt t 0.00 mit der Applikation des Nasensprays. Er wurde angewiesen alle 30 Sekunden zwei Sprühstöße in die linke und rechte Nasenöffnung zu geben. Der Flascheninhalt wurde so innerhalb von 15 Minuten verabreicht unter Einbeziehung eines maximalen Rests von 0,5 ml.

In viertelstündigen Abständen beginnend mit dem Zeitpunkt  $t$  0.00 wurden folgende Parameter im Blut der Probanden bestimmt: Blutzucker (IHT-Gruppe), ANP, Vasopressin, ACTH, Cortisol, kleines Blutbild, Osmolalität und Natrium. Zum gleichen Zeitpunkt wurden jeweils Blutdruck und Puls gemessen. 30 Minuten nach Versuchsbeginn wurde zur Stimulierung der Aktivität der HHN-Achse eine Stressreaktion provoziert. Je nach Zuordnung zu der Versuchsgruppe erhielten die Probanden der IHT-Gruppe 0.125 I.E. kurzwirksames Humaninsulin pro kg Körpergewicht (Insuliman®, Fa. Aventis), die der CRH/VP-Gruppe 0,5 IU Vasopressin (Fa. Parke-Davis) als Kurzinfusion über 6 Minuten intravenös sowie in der dritten Minute der Infusion 50  $\mu$ g CRH (Fa. Ferring) als Bolus. Während der Hypoglykämie-Phase in der IHT-Gruppe wurden die Blutzuckerwerte engmaschig kontrolliert. Nach einem Absinken des Blutzuckerwertes unter 40 mg/dl wurde die Hypoglykämie durch intravenöse Gabe einer 10%igen Glukoselösung beendet und bis zum Zeitpunkt  $t$  2h 30min die regelmäßigen Blutentnahmen fortgesetzt. Zu den Zeitpunkten  $t$  0:00,  $t$  0.30,  $t$  1.00,  $t$  1.30 und  $t$  2.30 wurde der Proband aufgefordert, das Ausmaß seines Hungers, Durstes und seiner Müdigkeit auf einer Skala von 1 bis 10 einzuordnen. Nach Versuchsablauf gab der Proband eine zweite Urinprobe ab, deren Volumen und Osmolalität bestimmt wurden (s. Abb. 2).

Die Blutabnahmen erfolgten mit Monovetten R (Fa. Sarstedt). Die Röhrchen für die ANP-Bestimmung waren zuvor gekühlt gelagert worden. Über den Drei-Wege-Hahn wurden zunächst 2 ml Blut mit einer Einwegspritze entnommen und verworfen. Für die Bestimmung von ACTH, Vasopressin und ANP wurden jeweils 9 ml Blut in ein Plasmaröhrchen, für die Bestimmung von Cortisol 4 ml in ein Serumröhrchen entnommen. Die Proben wurden bei einer Temperatur von 4°C und einer Umdrehungszahl von 400 0/Minute zentrifugiert (Kältezentrifuge 2K15, Fa. Sigma). Danach wurde das Plasma für die ANP-, Vasopressin- und ACTH-Bestimmung und das Serum für die Cortisol-Bestimmung in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und bei -20 °C bis zum Zeitpunkt der Messung tiefgefroren. Für die Bestimmung von Natrium, Osmolalität und kleinem Blutbild wurde jeweils 1 ml Blut entnommen. Die Bestimmung der Blutglukosekonzentration wurde während der ersten zehn Versuche mit der Glukose-Oxidase-Methode durch den Glukose Analyzer 2 (Fa. Beckmann

Instruments) durchgeführt, in den folgenden Versuchen photometrisch durch den HemoCue B-Glukose Data Management Analyzer (Fa. HemoCue AB, Schweden).

11.45 h	Proband gibt die erste Urinprobe ab, Fragebogen	
12.00 h (t 0:00)	Blutentnahme, Messung von Blutdruck, Puls und Blutzucker, Beginn der ANP-Applikation	
12.15 h (t 0:15)	Blutentnahme, intranasale ANP-Applikation beendet	
12.30 h (t 0:30)	Blutentnahme, Messung von Blutdruck, Puls und Blutzucker, Fragebogen, Insulingabe i.v.	
12.35 h (t 0:35)	Blutzuckerspiegelkontrolle	
12.40 h (t 0:40)	Blutzuckerspiegelkontrolle	
12.45 h (t 0:45)	Blutentnahme, Messung von Blutdruck, Puls und Blutzucker	zwischen 0:45 und 1:00 Beginn der Glukose-Infusion
13.00 h (t 1:00)	Blutentnahme, Messung von Blutdruck, Puls und Blutzucker, Fragebogen	
13.15 h (t 1:15)	Blutentnahme, Messung von Blutdruck, Puls und Blutzucker	
13.30 h (t 1:30)	Blutentnahme, Messung von Blutdruck, Puls und Blutzucker, Fragebogen	
13.45 h (t 1:45)	Blutentnahme, Messung von Blutdruck, Puls und Blutzucker	
14.00 h (t 2:00)	Blutentnahme, Messung von Blutdruck, Puls und Blutzucker	
14.15 h (t 2:15)	Blutentnahme, Messung von Blutdruck, Puls und Blutzucker	
14.30 h (t 2:30)	Blutentnahme, Messung von Blutdruck, Puls und Blutzucker, Fragebogen	
14.45 h (t 2:45)	Proband gibt die zweite Urinprobe ab	

Abb. 2: Schematisch dargestellter Versuchsablauf der IHT-Versuchsreihe

## **2.4 Testsubstanz**

### **Atriales natriuretisches Peptid**

Für die Studie wurde folgende Substanz verwendet: ANF (1-28) Human der Fa. Calbiochem in lyophilisierter Form. Die Herstellung erfolgte über eine Festphasen-Peptid-Synthese. Eine Probe zur intranasalen Applikation enthielt jeweils 1 mg ANP gelöst in 3,5 ml NaCl.

Aufgrund der unter 1.4 beschriebenen Wirkung von ANP können folgende Nebenwirkungen beim gesunden Probanden auftreten: Bradykardie, plötzlicher Blutdruckabfall und in der Folge Übelkeit, Schwindel- oder Schwächegefühl.

## **2.5 Chemische Untersuchungsmethoden**

Alle Blutproben wurden im Doppelansatz mit demselben Assay bestimmt und anschließend der Mittelwert der einzelnen Messungen gebildet. Es wurden halbautomatische Kits verwendet.

### **2.5.1 Adrenocorticotropes Hormon**

Die Konzentration von ACTH im Plasma wurde durch einen spezifischen immunoluminometrischen Zweischnitt-Assay (LUMItestR® ACTH, Fa. Brahms Diagnostika GmbH) bestimmt. Zwei antigenspezifische monoklonale Antikörper erkennen das ACTH an jeweils verschiedenen Determinanten. Einer der Antikörper ist an der Innenseite des Testöhrchens fixiert (Coated Tube Technik). Dieser Antikörper bindet im ersten Reaktionsschritt nach Zugabe der Probe das

ACTH und extrahiert es so aus dem Plasma. Der zweite Antikörper ist lumineszenz-markiert (Tracer). Der Tracer bindet an das ACTH, das bereits an den Antikörper der ersten Reaktion gebunden ist. Nach viermaligem Auswaschen des Antikörperüberschusses wird das Lumineszenzsignal und damit der in der Röhrenwand gebundene Traceranteil im Luminometer gemessen. Der Traceranteil der Probe verhält sich direkt proportional zur ACTH-Konzentration, sodass sie anhand einer Standardkurve ermittelt werden kann. Die Normwerte liegen morgens bei 10-60 pg/ml, abends bei 6-30 pg/ml. Das untere Detektionslimit des verwendeten Assays beträgt 2 pg/ml. Der Intra-Assay bzw. Inter-Assay-Variationskoeffizient des Assays beträgt <4% bzw. <8%.

### 2.5.2 Cortisol

Das Cortisol im Plasma wurde mittels eines kompetitiven Festphasenimmunassays („Coat-A-Count“® Cortisol RIA, Fa. DPC Biermann GmbH) bestimmt. Radioaktives Cortisol ( $J^{125}$ ) konkurriert in diesem Assay mit dem Cortisol aus dem Probandenplasma um die Bindungsstelle an spezifischen Cortisol-Antikörpern, die auf der Innenwand von Polypropylenröhren fixiert sind. Im Anschluss an die vorgeschriebene Inkubationszeit wird die Flüssigkeit abgegossen oder abgesaugt. Das Röhren, das die antikörpergebundene Fraktion enthält, wird dann im Gamma Counter gemessen. Die Zählrate nimmt mit steigender Cortisolkonzentration im Probandenplasma ab. Gleichzeitig bestimmte Standardseren mit bekanntem Cortisolgehalt liefern die Standardkurve, anhand derer die Cortisolkonzentration der Probe abgelesen werden kann. Das in diesem Assay verwendete Antiserum ist hochspezifisch, weil es eine sehr niedrige Kreuzreaktivität für andere natürlich vorkommende Steroide besitzt. Die Normalwerte für Cortisol betragen am Morgen 5-25 µg/dl, am Abend 2-12 µg/dl. Bei Konzentrationen zwischen 1,0 und 50 µg/dl beträgt der Intra-Assay-Variationskoeffizient <3% und der Inter-Assay-Variationskoeffizient <5%.



### **2.5.3 Vasopressin**

Für die Bestimmung des Vasopressins im Plasma wurde ein spezifischer Radioimmunassay (Vasopressin DirektR®, Fa. Hermann Biermann GmbH) verwendet. Ohne vorherige Extraktion aus dem Plasma misst dieser Assay immunreaktives Vasopressin mit einem modifizierten Radioimmunassay (RIA). Ein zweiter Antikörper, der an eine feste Phase gebunden ist, separiert die Komplexe aus der Probe. Die Normalwerte liegen im Bereich von 0 - 6,7 pg/ml, wobei das untere Detektionslimit des Assays bei 0,6 pg/ml liegt. Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizient betragen <9,3% und <20,2% bei Konzentrationen zwischen 1,2 und 80 pg/ml.

### **2.5.4 Atriales natriuretisches Peptid**

Anhand eines spezifischen Radioimmunassays (Nichols Institute, Bad Nauheim) wurden die Plasmakonzentrationen der Proben bestimmt. Radioaktiv markiertes ANP konkurriert in zwei Inkubationsperioden mit dem nicht markierten ANP der Probe um die Bindung an spezifische Antikörper. Das gebundene ANP wird nach Ablauf der Inkubationszeit durch eine feste Phase extrahiert und in einem Gamma Counter gemessen. Die ANP-Konzentration der Probe ist umgekehrt proportional zur gemessenen Zählrate des Gamma Counters. Der Normalwert für ANP beträgt 2-80 pmol/l. Das untere Detektionslimit des Assays liegt bei 15 pg/ml. Intra- und Interassay-Variationskoeffizient betragen <7,7 % und <14,5 % für Werte zwischen 0 und 1000 pg/ml.

## 2.6 Statistische Auswertung

Die Mittelwerte der gemessenen Blutparameter sowie von Blutdruck und Puls wurden mittels Kovarianzanalyse (ANCOVA) auf ihre Signifikanz überprüft. Die Analyse beinhaltete Messwertwiederholungsfaktoren für Behandlung (ANP, Placebo) und Zeitpunkt (Messpunkte nach IHT bzw. CRH/VP) Die Messwerte zum Zeitpunkt t 0.00 dienten als Kovariante. Die Urinwerte wurden mittels ANOVA (Varianzanalyse) ausgewertet. Die Angaben auf den Fragebogen wurden mit nicht-parametrischen Tests (Wilcoxon, Kruskal-Wallis) evaluiert. Ein p-Wert <0.05 wurde als signifikant erachtet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 ANP-Plasmaspiegel

Allgemein lagen die ANP-Plasmaspiegel (Abb. 3) unter beiden Versuchsbedingungen durchschnittlich im unteren Messbereich des Essays zwischen 15 und 25 pg/ml (Normwerte 9-68 pg/ml). Im Vergleich zur Placebogruppe kam es bei den mit ANP vorbehandelten Patienten 25-30 Minuten nach Beginn der intranasalen Applikation zu einem leichten Anstieg der ANP-Plasmakonzentration um durchschnittlich 6,1 pg/ml ( MW  $\pm$  SEM der maximalen ANP-Konzentration  $21,5 \pm 1,4$  pg/ml, unter Placebobedingungen:  $15,6 \pm 1,4$  pg/ml;  $p < 0.01$ ), sodass von einem geringfügigem Übertritt des Peptids in den systemischen Kreislauf ausgegangen werden kann. Diese Form der Verabreichung erreichte jedoch nicht annähernd die Plasmakonzentrationen einer systemischen Applikation. In vergleichbaren Studien, in denen der Teststoff ANP intravenös verabreicht wurde, traten ANP-Plasmakonzentrationen über 2000 pg/ml auf (Bierwolf et al. 2002). Der Anstieg war zudem vorübergehend und die ANP-Konzentration erreichte noch vor Beginn der Stimulationstests ihren Ausgangswert. Im weiteren Verlauf blieben die Konzentrationen in beiden Behandlungsgruppen vergleichbar. Eine signifikante Veränderung unter der Stimulation konnte nicht nachgewiesen werden.

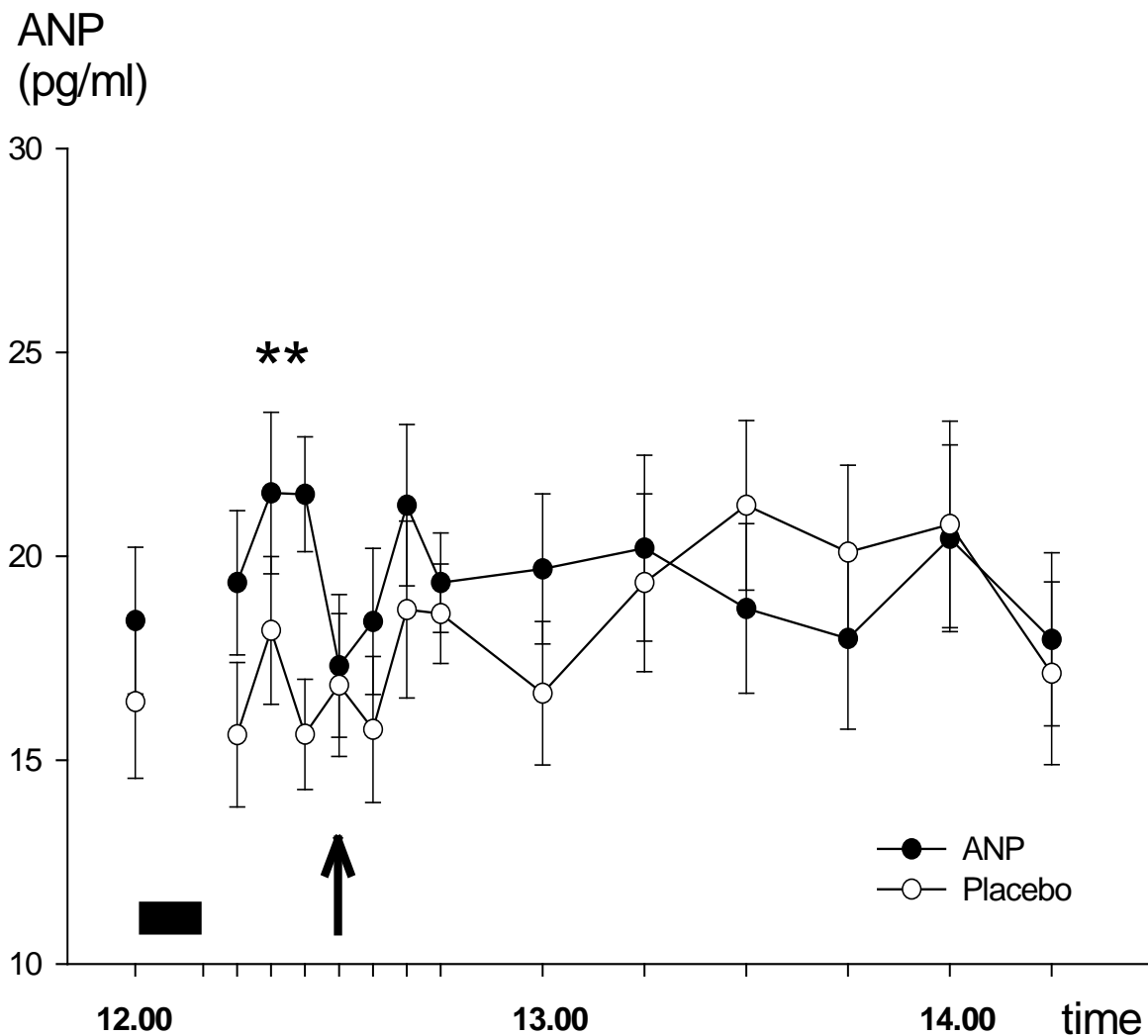


Abb. 3: Durchschnittliche ( $\pm$ SEM) Plasmakonzentration von ANP nach intranasaler Administration von 1 mg ANP (geschlossene Kreise) und Placebo (offene Kreise),  $n=12$ . Schwarzer Balken: Intranasale Administration des Teststoffs, Pfeil: Zeitpunkt der Stimulation durch IHT oder CRH/VP.  $P < 0,01$  für die Differenzen zwischen den Effekten der Placebo- und Verumgruppe.

### 3.2 Effekte von ANP auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse nach Stimulation durch den Insulin-Hypoglykämie-Test

Die Ausgangswerte der Blutglukose waren in beiden Behandlungsgruppen vergleichbar und entsprachen den Normwerten (ANP-Gruppe  $89,1 \pm 5,6$  mg/dl; Placebo  $95,4 \pm 4,4$  mg/dl). Nach der Insulininjektion sank der Blutglukosespiegel schnell auf Werte unter 40 mg/dl, die ebenfalls unter beiden Versuchsbedingungen vergleichbar waren (ANP-Gruppe:  $39,9 \pm 3,5$  mg/dl; Placebo-Gruppe  $37,2 \pm 3,7$  mg/dl;  $p > 0,6$ ). Effekte von intranasalem ANP auf die basalen Plasmakonzentrationen von Cortisol und ACTH unmittelbar nach Applikation der Testsubstanz wurden nicht beobachtet. Unter der Vorbehandlung mit ANP wurde die nachfolgende stimulierte Sekretion von ACTH (Abb. 4) 45 bis 75 Minuten nach der Hypoglykämie gehemmt. Der Peak der Plasmakonzentration des ACTH erreichte in dieser Versuchsgruppe nur die Hälfte der maximalen ACTH-Plasmakonzentration in der Placebogruppe (ANP-Gruppe:  $22,4 \pm 7,6$  pg/ml; Placebo-Gruppe:  $52,3 \pm 8,1$  pg/ml;  $p < 0,05$ ). Für die Fläche unter der Kurve (AUC) bestand demzufolge ein deutlich geringerer Wert nach Vorbehandlung mit ANP ( $12106,5 \pm 1974$  pg/ml min) als unter Placebobedingungen ( $21777,0 \pm 1974$  pg/ml min;  $p < 0,05$ ). In einem ähnlichen Zeitraum, 60 bis 90 Minuten nach der Insulininjektion, wurde ebenfalls eine Hemmung der Cortisolsekretion (Abb. 5) beobachtet. Die gemessene Serumkonzentration von Cortisol nach ANP-Gabe lag im Durchschnitt nahezu  $7 \mu\text{g/dl}$  unter derjenigen der Kontrollgruppe (ANP-Gruppe  $12,9 \pm 1,6$   $\mu\text{g/dl}$ ; Placebo-Gruppe  $19,3 \pm 1,7$   $\mu\text{g/dl}$ ;  $p < 0,01$ ). Die AUC betrug entsprechend  $7812,0 \pm 861$   $\mu\text{g/dl}$  nach ANP-Applikation,  $11508,0 \pm 861$   $\mu\text{g/dl}$  unter Placebobedingungen ( $p < 0,01$ ).

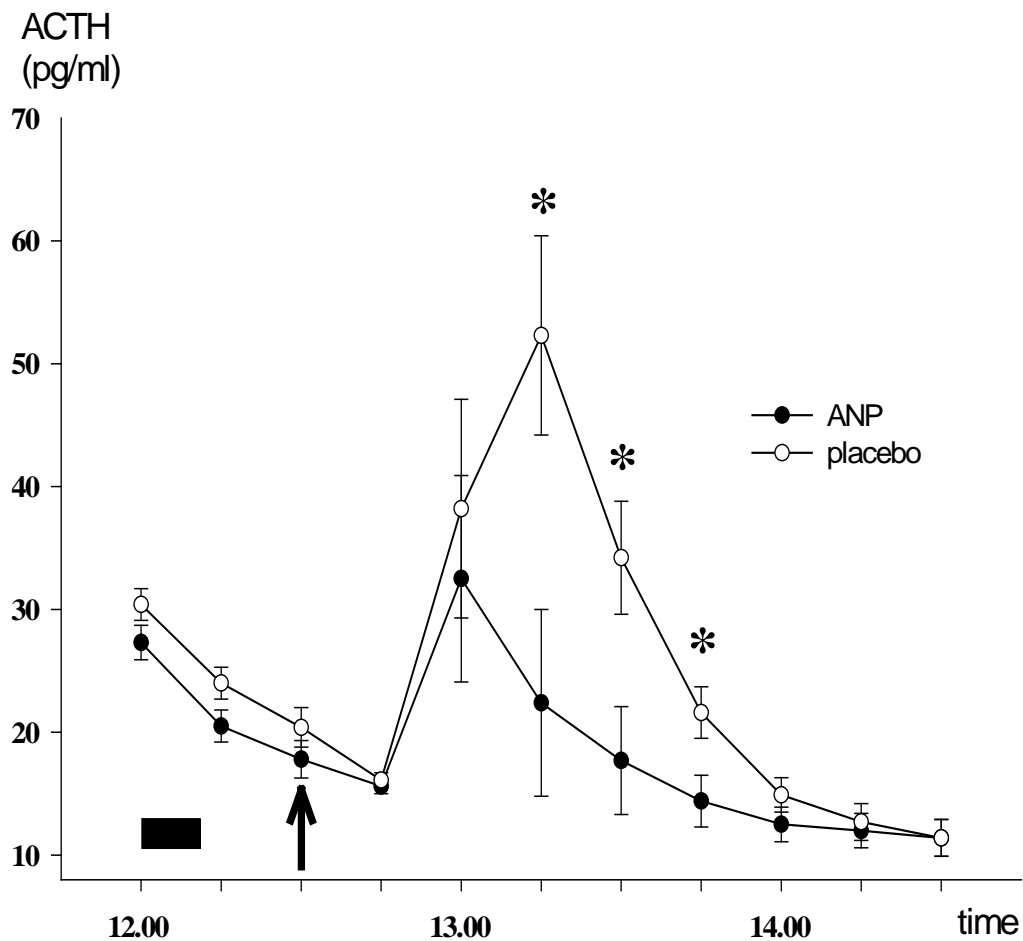


Abb. 4: Durchschnittliche ( $\pm$  SEM) Plasmakonzentration von ACTH nach Standard IHT (n=12). Messung nach Vorbehandlung mit ANP (geschlossene Kreise) bzw. mit Placebo (offene Kreise). Schwarzer Balken: Intrasale Administration des Teststoffs, Pfeil: Zeitpunkt Insulininjektion. \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$  für die Differenzen zwischen den Effekten nach Placebo- bzw. Verumgabe.

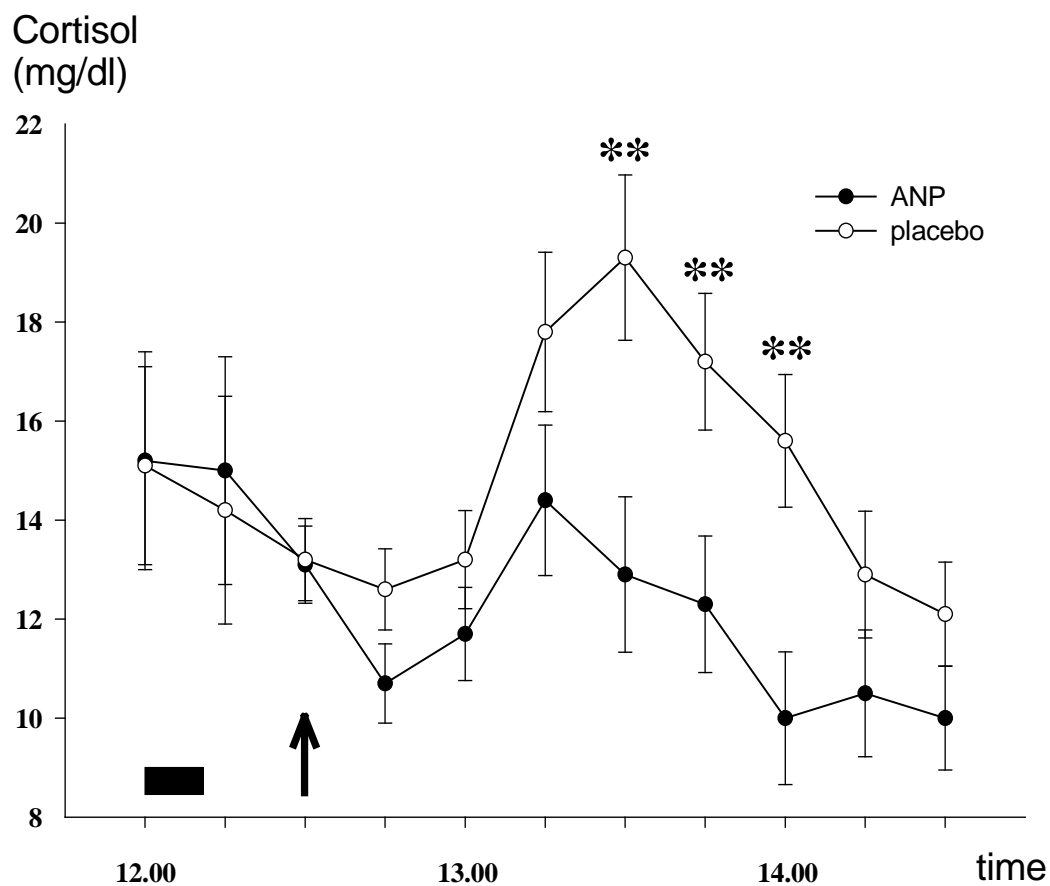


Abb. 5: Durchschnittliche ( $\pm$  SEM) Plasmakonzentration von Cortisol nach Standard IHT ( $n=12$ ). Messung nach Vorbehandlung mit ANP (geschlossene Kreise) bzw. mit Placebo (offene Kreise). Schwarzer Balken: Intrasale Administration des Teststoffs, Pfeil: Zeitpunkt der Insulininjektion. \*,  $P<0,05$ ; \*\*,  $P<0,01$  für die Differenzen zwischen den Effekten nach Placebo- bzw. Verumgabe.

### **3.3 Effekte von ANP auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse nach Stimulation durch den CRH/VP-Test**

Die kombinierte Gabe von CRH und Vasopressin induzierte einen hohen Anstieg der Cortisol- und ACTH-Plasmaspiegel. Unterschiede zwischen der vorbehandelten und der Placebo-Gruppe wie sie nach Stimulation mit dem IHT auftraten, konnten nicht beobachtet werden (Abb. 6 und 7). Die maximale Konzentration sowie der zeitliche Verlauf der ACTH-Kurve stellten sich nahezu identisch dar (ANP-Gruppe:  $67,8 \pm 9,1$  pg/ml; Placebo-Gruppe:  $67,2 \pm 10,0$  pg/ml;  $p > 0,7$ ). Ein vergleichbares Ergebnis fand sich für den Cortisolspiegel. Es bestand keine signifikante Differenz zwischen den beiden Versuchsgruppen (maximale Konzentration der ANP-Gruppe:  $18,4 \pm 1,1$  µg/dl; Placebo-Gruppe:  $17,8 \pm 1,3$  µg/dl;  $p > 0,7$ ).



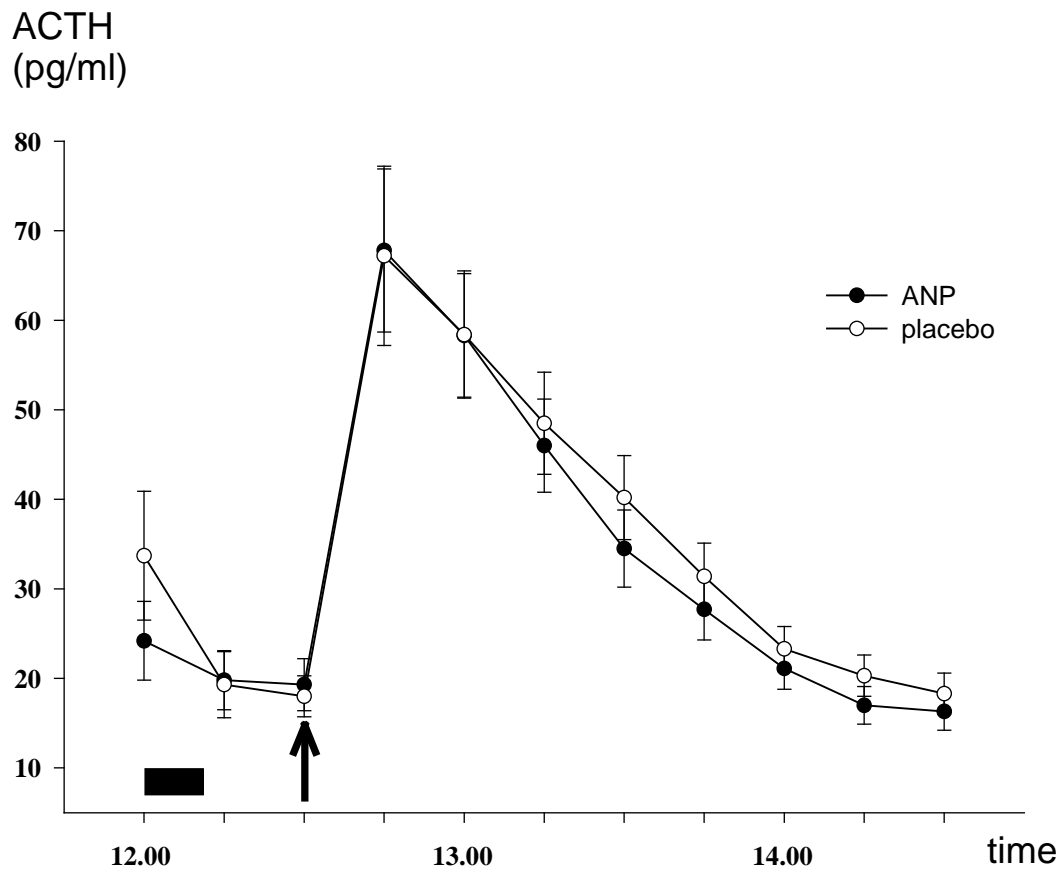


Abb. 6: Durchschnittliche ( $\pm$  SEM) Plasmakonzentration von ACTH nach kombinierter Gabe von CRH und VP ( $n=9$ ). Messung nach Vorbehandlung mit ANP (geschlossene Kreise) bzw. mit Placebo (offene Kreise). Schwarzer Balken: Intrasale Administration des Teststoffs, Pfeil: Zeitpunkt der Stimulation durch CRH/VP. Signifikante Differenzen zwischen der Placebo- und Verumgruppe bestanden nicht.

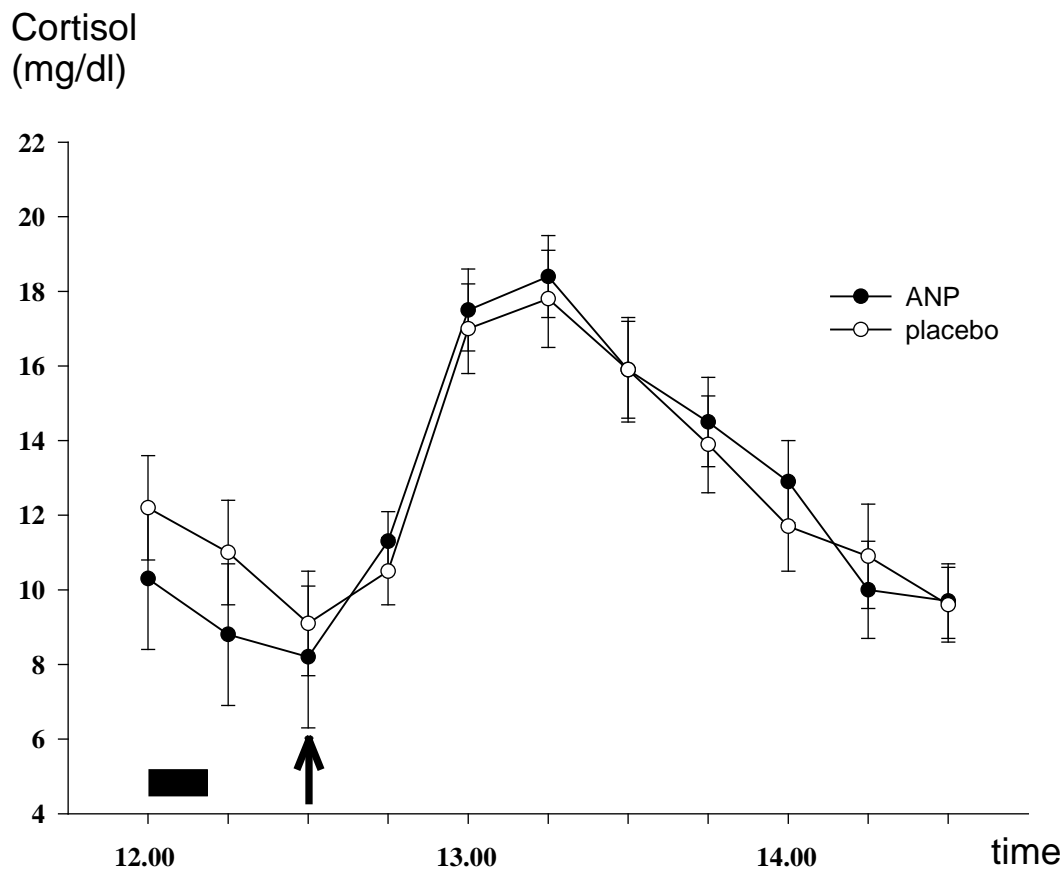


Abb. 7: Durchschnittliche ( $\pm$  SEM) Plasmakonzentration von ACTH nach kombinierter Gabe von CRH und VP ( $n=9$ ). Messung nach Vorbehandlung mit ANP (geschlossene Kreise) bzw. mit Placebo (offene Kreise). Schwarzer Balken: Intranasale Administration des Teststoffs, Pfeil: Zeitpunkt der Stimulation durch CRH/VP. Signifikante Differenzen zwischen der Placebo- und Verumgruppe bestanden nicht.

### **3.4 Wirkung von ANP auf Parameter des Wasserhaushalts, Blutdruck und Herzfrequenz**

In regelmäßigen Abständen wurden Blutproben zur Bestimmung von Hämatokrit, Serum-Natrium und Vasopressin entnommen. Zudem wurden Urinvolumen, Urinnatrium, Blutdruck und Puls bestimmt. Keiner dieser Parameter zeigte nach ANP-Applikation signifikante Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 1).

	Placebo		ANP	
	t= 30 min mean (SEM)	t=150 min mean (SEM)	t= 30 min mean (SEM)	t=150 min mean (SEM)
Hämatokrit (%)	<b>0,397</b> (0,01)	<b>0,374</b> (0,01)	<b>0,391</b> (0,01)	<b>0,386</b> (0,01)
Serumnatrium (mmol/l)	<b>141,2</b> (0,5)	<b>138,3</b> (0,7)	<b>140,8</b> (0,5)	<b>139,8</b> (0,6)
Plasma Vasopressin (pg/ml)	<b>5,74</b> (0,41)	<b>4,79</b> (0,36)	<b>4,94</b> (0,39)	<b>4,37</b> (0,33)
Urinmenge (ml)	-	<b>217</b> (33)	-	<b>179</b> (31)
Urin-Natrium (mmol/l)	-	<b>140,4</b> (18,7)	-	<b>135,8</b> (17,6)
Blutdruck Systolisch (mmHg)	<b>130,9</b> (2,2)	<b>128,9</b> (4,2)	<b>126,5</b> (2,3)	<b>126,8</b> (5,0)
Diastolisch (mmHg)	<b>70,0</b> (3,3)	<b>71,4</b> (1,7)	<b>72,9</b> (3,4)	<b>68,0</b> (1,9)
Puls (Schläge/min)	<b>70,0</b> (3,2)	<b>67,3</b> (1,6)	<b>68,0</b> (3,1)	<b>67,0</b> (1,7)

*Tabelle 1: Hämatokrit, Serumnatrium, Vasopressin, Urinnatrium, Blutdruck und Herzfrequenz nach intranasaler Administration von ANP (1mg) und Placebo (n=9). Die Werte von Hämatokrit, Serumnatrium, Vasopressin, Urinnatrium, Blutdruck und Herzfrequenz sind baseline-korrigiert (Kovarianzanalyse). Die Basalwerte vor Applikation des Teststoffs dienten als Kovariante. Der Übersicht halber sind die Werte vor den Simulationstests (t=30 min) und am Ende des Versuchs (t=150 min) dargestellt. Die Urinmenge entspricht dem Urinvolumen in einem 2,5 Stunden-Abschnitt. Zwischen den verschiedenen Behandlungsbedingungen bestanden keine Signifikanzen.*

## 4. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen die Hemmung der stimulierten Freisetzung von ACTH und Cortisol nach Vorbehandlung mit ANP. ANP hemmt die HHN-Achse nach Stimulation mit dem IHT, nicht jedoch nach Stimulation mittels CRH/VP. Der selektive Effekt auf die hypothalamisch-hypophysäre Antwort nach IHT legt nahe, dass beim Menschen ANP auf einen zentralnervösen Mechanismus der HHN-Achsen-Aktivierung, vermutlich im Hypothalamus, wirkt.

Ein inhibitorischer Einfluss von ANP auf die HHN-Achse wurde bereits mehrfach vorbeschrieben. In-vitro-Studien weisen auf die Existenz eines Corticotropin-release-inhibiting factors (CRIF) hin (Engler et al. 1999). Aus dem Gewebe der Eminentia mediana von Ratten wurde mittels Gelchromatographie eine Fraktion extrahiert, die einen sekretionshemmenden Einfluss auf ACTH zeigte (Gillies et al. 1982). Redei und Endröczy isolierten 1983 ebenfalls einen CRIF. Er wurde Ratten 1 Minute nach Stimulation durch 10 Elektroschocks intravenös verabreicht, und es zeigte sich ein signifikant geringerer Plasmacortisolspiegel als in der mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe. Diese Differenz konnte 40 Minuten nach der Injektion nicht mehr nachgewiesen werden. Aus Gewebe des Rinderhypothalamus wurde ein Faktor isoliert, der einen hemmenden Effekt auf die ACTH-Freisetzung aus kultivierten anterioreren Hypophysenzellen von Ratten hatte. Das isolierte Material wurde den Tieren 5 Min vor oder 1 Min nach Stimulation durch einen Elektroschock intravenös verabreicht. Die gemessenen Cortisolspiegel lagen nach 20 Minuten signifikant unter denen der Kontrollgruppe. In der gleichen Studie wurde eine Senkung der basalen ACTH-Sekretion über 40 Min bei nicht stimulierten Ratten gemessen (Redei und Ewans 1989). Alle diese Studien deuten darauf hin, dass ein oder mehrere Faktoren existieren, die eine inhibitorische Kontrolle über die HHN-Achse ausüben.

Aufgrund der bisherigen Forschungsergebnisse wird eine solche Funktion auch ANP zugeschrieben. ANP wurde 1984 erstmals außerhalb des Herzvorhofs im Hypothalamus nachgewiesen (Tanaka et al. 1984). In weiterführenden Studien

wurde gezeigt, dass das Peptid im Hypothalamus synthetisiert und seine Ausschüttung neben osmotisch wirksamen Substanzen wie Kalium und Natrium auch durch CSF stimuliert wird (Tanaka und Inagami 1986, Shibasaki et al. 1988, Nissen et al. 1989). Die systemische Administration von ANP führte zu verminderten ACTH-Plasmaspiegeln (Hattori et al. 1986, Engler et al. 1999). Für intraventriculär verabreichtes ANP wurde kein Effekt auf den basalen ACTH-Spiegel nachgewiesen, es wurde jedoch ein verminderter Anstieg der ACTH- und Cortisolspiegel nach Angiotensin II-Applikation gezeigt (Takao et al. 1988). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der hemmende Effekt von ANP auf hypothalamischer Ebene wirksam wird. Diese Vermutung wird durch das Ergebnis, dass ANP in vitro die CRH-Ausschüttung aus dem Hypothalamus hemmt, unterstützt (Ibanez-Santos et al. 1990). Auch im Tierversuch inhibierte ANP nach cerebroventrikulärer Applikation die Aktivität der HHN-Achse (Gutkowska et al. 1997). Probandenstudien, die bislang eine intravenöse Applikation verwendeten, kam es zu divergenten Ergebnissen. Sie belegen sowohl einen hemmenden Einfluss des ANP als auch eine mangelhafte Wirkung. Ur et al. stellten 1991 fest, dass morgens verabreichtes ANP beim gesunden Menschen die CRH-stimulierte ACTH-Ausschüttung nicht beeinflusst. Von Kentsch et al. 1992 konnten ANP inhibitorische Effekte nach morgendlicher Gabe zugeschrieben werden. Während einer Stimulation der HHN-Achse durch CRH wurde ein klarer Abfall der ACTH und Cortisolspiegel nach ANP-Applikation beobachtet (Kellner et al. 1992). Unter der Annahme, dass ANP die Bluthirnschranke nur in geringem Maße überwindet und nur in hoher Dosierung im Gehirn eine wirksame Konzentration erreicht, kann die verabreichte Dosis ein Erklärungsmodell für diese unterschiedlichen Ergebnisse sein (Bierwolf et al. 1998). So führte die Infusion von 4,4 bzw. 8,8 µg ANP/min über 45 bzw. 90 min zu einer ca. eine Stunde anhaltenden Senkung der ACTH- und Cortisol-Plasmaspiegel (Bierwolf et al. 1998). Eine niedriger dosierte Infusion von 0,01 µg/kg KG/min über 30 min zeigte keinen Effekt (Ur et al. 1991). In der Studie von Bierwolf et al. 1998 kam es, ähnlich wie es auch schon Kellner et al. 1995 beschrieben hatten, nach Applikation der höheren ANP-Dosis von 8,8 µg ANP/min über 90 min zu einer Umkehrung der inhibitorischen Wirkung. Vermutlich wurde im Sinne einer

Gegenregulation die HHN-Achse verstärkt aktiviert. Im Vergleich zur Placebogruppe wurde ein signifikanter Anstieg der ACTH- und Cortisolspiegel sowie ein mäßiger Anstieg des Vasopressinspiegels und eine parallel dazu steigende Herzfrequenz ca. eine Stunde nach Ende der ANP-Applikation beobachtet. Die ANP-Plasmakonzentration stieg im Verlauf auf über 2000 pg/ml. In der Literatur wird beschrieben, dass eine unter systemischer ANP-Applikation auftretende Hypovolämie mit konsekutiver Hypotension eine CRH- und Vasopressin-Freisetzung zur Folge hat (Bähr et al. 1987, Abramow und Cogan 1993, Robinson und Fitzsimmons 1993). Der kompensatorische Anstieg der HHN-Aktivität in den genannten Studien entsteht möglicherweise infolge der systemischen Nebenwirkungen des ANP. Dafür spricht, dass in der Studie von Bierwolf et al. 1998 der Effekt bei Verabreichung einer niedrigeren ANP-Dosis von 4,4 µg ANP/min über 45 min nicht auftrat.

Da eine Reaktion der basalen HHN-Aktivität auf ANP beim gesunden Probanden bislang nicht nachgewiesen werden konnte (Kellner et al. 1992), wurde in den angeführten Probandenstudien die stimulierte Aktivität untersucht. Die Stimulation erfolgte in diesen Studien mit CRH/VP, das die HHN-Achse auf hypophysärer Ebene zur Sekretion anregt (Ur et al. 1991, Kellner et al. 1992, Kellner et al. 1995, Bierwolf et al. 1998). Mit dieser Methode wird jedoch nur die inhibitorische Wirkung von ANP auf die Hypophyse untersucht. Sie hat keinen stimulierenden Effekt auf übergeordnete Zentren wie den Hypothalamus. Obwohl Studien zeigen, dass ANP an hypophysären Zellen die Guanylatcyclase und die cGMP-Ausschüttung stimuliert und ACTH durch cGMP gehemmt werden kann (Abou-Samra et al. 1987, Antoni und Dayanithi 1989 und 1990, King und Bärtschi 1989), besteht ein hemmender Effekt von ANP auf hypophysäre Zellen nur in vitro. Beim Menschen konnte kein direkter inhibitorischer Einfluss von ANP auf die Hypophyse belegt werden. Diese Ergebnisse schließen einen Einfluss von appliziertem oder körpereigenem ANP auf die Hypophyse nicht aus. Sie exprimiert ANP-Rezeptoren und kann theoretisch mit einer Reduktion der Synthese von Proopiomelanocortinpeptiden auf die Anwesenheit von ANP im systemischen Kreislauf reagieren (Mantyh et al. 1987, Foresta et al 1988, Tan et al. 1994). Die bisherigen Studien bieten jedoch wenig Belege für die These, dass systemisch

zirkulierendes ANP die Hypophyse direkt aktiviert und auf diesem Weg einen inhibitorischen Einfluss auf die ACTH und Cortisol-Freisetzung nimmt. Weitere Hinweise für eine intracerebrale Hemmung der HHN-Achse ergeben sich aus Tierversuchen und in-vitro-Studien. Diese Arbeiten beschrieben einerseits ANP-sensible immunreaktive Neuronen, andererseits eine hohe Dichte an ANP-Rezeptoren in bestimmten Hirnregionen wie den präoptischen und paraventriculären Kernen des Hypothalamus (Gutkowska et al. 1997). Eine Hemmung der Stressinduzierten Freisetzung von CRH, Vasopressin und ACTH wurde nach intracerebroventriculärer Injektion von ANP beobachtet (Samson 1985, Iitake et al. 1986, Itoh et al. 1986, Takao et al. 1988, Ibanez-Santos et al. 1990). Nach systemischer Applikation wurde keine inhibitorische Wirkung des ANP auf die stimulierte ACTH-Freisetzung belegt (Hashimoto et al. 1987).

Als Alternative zur Stimulation mittels CRH/VP auf hypophysärer Ebene bietet sich der Insulin-Hypoglykämie-Test an, da seine Wirkung über den Hypothalamus vermittelt wird (Yang et al. 1999). In hypothalamischem Gewebe nachgewiesene Glukosesensoren reagieren über den erniedrigten Blutglukosespiegel mit einer Steigerung der HHN-Achsenaktivität. Der folgende Anstieg der ACTH- und Cortisolkonzentration kann demnach eindeutig dem Hypothalamus zugeschrieben werden. Aussagen über übergeordnete Zentren sind nicht möglich.

Nach IHT bewirkt die Vorbehandlung mit intranasalem ANP in der vorliegenden Studie einen signifikant geringeren Anstieg, einen um ca. 15 Minuten vorgezogenen Peak der ACTH- und Cortisol-Plasma-Spiegel (s. Abb. 4 und 5) und somit eine deutlich geringere Aktivierung der HHN-Achse. Interessanterweise zeigt sich trotz inhibitorischer Wirkung auf die hypophysär- adrenale Aktivität keine Erhöhung des systemischen ANP-Spiegels. Nur ein geringer Anteil des verabreichten ANP wurde in den systemischen Kreislauf resorbiert. Es konnte eine geringgradige Erhöhung der ANP-Plasmakonzentration um durchschnittlich 6 pg/ml ca. 15 Minuten nach abgeschlossener Applikation gemessen werden. Während der folgenden Stimulationstests und des weiteren Versuchsverlaufs lagen die Plasmaspiegel in beiden Behandlungsgruppen im unteren Normbereich, signifikante Unterschiede bestanden nicht (s. Abb.3). Im Vergleich zu bereits genannten Studien, in denen ANP intravenös appliziert und eine Hemmung der



HHN-Aktivität erst ab einer ANP-Plasmakonzentration von 200 pg/ml gezeigt wurde, konnte in der vorliegenden Studie der Einfluss von systemisch zirkulierendem ANP auf die hier erwähnten Effekte nach IHT ausgeschlossen werden (Bierwolf et al. 1998). Die Tatsache, dass Blutdruck und Parameter des Wasser- und Säure-Base-Haushalts (Serumnatrium, Hämatokrit, Urinnatrium und Urinvolumen) nicht durch die Verabreichung von ANP beeinflusst wurden, zeigt, dass die peripheren Zielorgane des ANP wie Herz, Gefäße oder Nieren durch das extern zugeführte Peptid nicht erreicht wurden.

Die Hemmung der Sekretion von Cortisol bleibt bis zum Ende des Versuchs nachweisbar, nimmt jedoch in den letzten 30 Minuten ab. Die Hemmung der ACTH Sekretion differiert signifikant zur Placebogruppe bis 45 Minuten vor Versuchsende. Den in der Literatur vorbeschriebenen kompensatorischen Anstieg der Kurven nach abgelaufener Inhibition beobachteten wir in dieser Studie nicht (Bierwolf et al. 1998). Das ist bei geringem systemisch zirkulierendem ANP vermutlich auf fehlende periphere Nebenwirkungen zurückzuführen. Andererseits wurden nach intracerebroventrikulärer ANP-Applikation im Tierversuch sehr wohl periphere Wirkungen in Form einer Verminderung des Blutdrucks und einer Erhöhung der Elektrolytexkretion und Diurese beobachtet (Gutkowska et al. 1997). Das Fehlen ähnlicher Effekte nach intranasaler Applikation in dieser Studie, ist schwer zu deuten. Möglicherweise beruhen die systemischen Nebenwirkungen auf deutlich höheren Konzentrationen der Testsubstanz im Liquor und in relevanten Hirnregionen im Tierversuch, als sie bei intranasaler Gabe beim menschlichen Probanden erreicht wurden. Eventuell war unser Studiendesign nicht ausreichend sensitiv für Veränderungen des Wasserhaushalts. Die Insulin-induzierte Hypoglykämie ist ein bekannter und wirksamer Stimulus für Durst, der vielleicht den Einfluss von ANP auf diesen Parameter maskiert hat.

Nach Stimulation mit CRH/VP wurde der oben beschriebene Effekt nicht gesehen. Wir beobachteten einen annähernd gleichen Verlauf der ACTH- und Cortisolspiegel (s. Abb. 6 und 7). Vor dem Hintergrund, dass die Menge des peripher zirkulierenden ANP sich nur geringfügig verändert, ist eine direkte Wirkung auf die Hypophyse mit dieser Form der Stimulation nicht möglich. Eine solche Wirkung konnte in vorherigen Studien nicht belegt werden (Hashimoto et

al. 1987, Mantyh et al. 1987, Foresta et al. 1988, Tan et al. 1994). Eine Wirkung auf den Hypothalamus lässt sich mit diesem Verfahren nicht nachweisen.

Die vorliegende Studie zeigt, dass ANP über den nasalen Transportweg das Gehirn erreicht und die mittels IHT stimulierte Sekretion von ACTH hemmt. Für diverse Neuropeptide wie Insulin, Vasopressin, MSH/ACTH 4-10, Cholezystokinin und GHRH wurde ein Transport über diesen Weg bereits nachgewiesen (Perras et al. 1999, Fehm et al. 2000). Die Menge des intranasal verabreichten ANP, die den systemischen Kreislauf erreichte, war sehr gering und erklärt die Passage zum Gehirn nicht, da ANP bekanntermaßen die Blut-Hirn-Schranke kaum überwindet (Levin et al. 1987, Ermisch et al. 1991). Unser Ergebnis unterstützt die Idee, dass ANP als corticotropin-release-inhibiting factor (CRIF) wirkt. Entsprechend der 1999 von Engler aufgestellten Hypothese gehört ANP in ein System der körpereigenen Hemmung der stressinduziert aktivierten HHN-Achse (Born und Fehm 1998). Unter der Annahme, dass die intranasale Applikation praktikabel und ohne Nebenwirkungen bleibt, können unsere Daten der erster Schritt auf dem Weg zur medikamentösen Behandlung von Erkrankungen sein, die mit einer erhöhten Aktivität der HHN-Achse einhergehen.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie untersuchte die Hypothese, dass intranasal verabreichtes Atriales Natriuretisches Hormon einen hemmenden Einfluss auf die stimulierte Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse hat. Daneben wurde die Frage gestellt, auf welcher Ebene diese Hemmung wirksam wird und welchen Einfluss das intranasal verabreichte Peptid auf Parameter des Wasserhaushalts und des Kreislaufs hat. 21 gesunden Probanden wurde nach dem Doppel-Blind-Prinzip jeweils 1 mg ANP gelöst in 3,5 ml NaCl oder aber ein Placebo (physiologische Kochsalzlösung) in Form eines Nasensprays verabreicht. Die HHN-Achse wurde anschließend entweder mittels Insulin-induzierter Hypoglykämie oder mittels CRH/VP stimuliert. Der IHT stimuliert die Aktivierung der HHN-Achse auf hypothalamischer Ebene, CRH/VP auf hypophysärer Ebene. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Plasmaspiegel von ACTH und Cortisol nach Vorbehandlung mit intranasalem ANP in der IHT-Gruppe signifikant unter denen der Placebogruppe lagen (ACTH: ANP-Gruppe  $22,4 \pm 7,6$  pg/ml, Placebo-Gruppe  $52,3 \pm 8,1$  pg/ml,  $p < 0,05$ ; Cortisol: ANP-Gruppe  $12,9 \pm 1,6$  µg/dl; Placebo-Gruppe  $19,3 \pm 1,7$  µg/dl,  $p < 0,01$ ; ANP: ANP-Gruppe  $21,5 \pm 1,4$  pg/ml, Placebo-Gruppe  $15,6 \pm 1,4$  pg/ml,  $p < 0,01$ ). In der CRH/VP-Gruppe zeigte sich keine signifikante Veränderung. Des Weiteren wurden vor und nach Versuchsablauf Urinmenge und -osmolalität sowie in regelmäßigen Abständen die Plasmaspiegel für ANP und Vasopressin, der Hämatokrit, die Serumosmolalität, Blutdruck und Puls bestimmt. Der ANP-Spiegel blieb während der gesamten Versuchsdauer im unteren Bereich des Durchschnitts. Er zeigte etwa 15 min nach abgeschlossener intranasaler Applikation einen leichten Anstieg, sodass wir von einem geringen Übertritt des Peptids in den systemischen Kreislauf ausgehen. Die übergetretene Menge reicht scheinbar nicht aus, um eine systemische Wirkung zu erzielen. Vasopressinplasmaspiegel, Hämatokrit und Serumosmolalität zeigen keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Placebogruppe. Das gleiche gilt für Urinmenge und -osmolalität sowie für Blutdruck und Herzfrequenz.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass ANP ein potenter Inhibitor des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Systems ist. Als CRIF agiert er vermutlich auf hypothalamischer Ebene. Intranasal verabreicht erreicht das Peptid zentrale Strukturen auf direktem Weg und führt nicht zu systemischen Veränderungen homöostatischer Parameter. Eine direkte Wirkung auf die Hypophyse konnte nach intranasaler Applikation nicht beobachtet werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abou-Samra AB, Catt KJ, Aguilera G (1987) Synthetic anfs (ANFs) stimulate guanine 3', 5'-monophosphate production but not hormone release in rat pituitary cells: peptide contamination with a gonadotropin-releasing hormone agonist explains luteinizing hormone-releasing activity of certain ANFs. *Endocrinology* 120:18-24
2. Abramow M, Cogan E (1993) The role of volume in the excretion of water loads. *Regul Pept* 45:217-223
3. Antoni FA, Dayanithi G (1989) Guanosine 3`5`cyclic monophosphate and activators of guanylate cyclase inhibit secretagogue-induced corticotropin release by rat anterior pituitari cells. *Biochem* 158:824-830
4. Antoni FA, Dayanithi G (1990) Secretion of ACTH by perfused isolated rat anterior pituitary cells: Pulses of secretagogue enhance the secretory response and modify the effect of atriopeptin. *J Endocrinol* 125:365-373
5. Arendt RM, Gerbes AL (1986): Atrial natiuretic factor in plasma of patients with arterial hypertension, heart failure or cirrhosis of the liver. *J Hypertension* 4:S131-S135
6. Axelrod J, Reisine TD (1984): Stress hormones: their interactins and regulation. *Science* 224:452-459
7. Bähr V, Henson J, Hader O, Oelkers W (1987) Effects of osmotically stimulated endogenous Vasopressin on basal and CRH-stimulated ACTH release in man. *Acta Endocrinol* 117:103-108

8. Behan DP, De Souza EB, Lowry PJ, Potter E, Sawchenko P, Vale WW (1995) Corticotropin releasing factor (CRF) binding protein: a novel regulator of CRF and related peptides. *Front Neuroendocrinol* 16: 362-382
9. Bierwolf C, Struve K, Marshall L, Born J, Fehm HL (1997) Slow wave sleep drives inhibition of pituitary-adrenal secretion in humans. *J Neuroendocrinol* 9:479-484
10. Bierwolf C, Burgemeister A, Lütke K, Born J, Fehm HL (1998) Influence of exogenous Atrial Natriuretic Peptide on the pituitary-adrenal response to Corticotropin-Releasing Hormone and Vasopressin in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1151-1157
11. Bierwolf C, Kern W, Molle M, Born J, Fehm HL (2000) Rhythms of pituitary-adrenal activity during sleep in patients with Cushing's disease. *Exp Clin Endocrinol Metab* 108:470-479
12. Bjorntorp P (2001) Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? *Obes Rev* 2:73-86
13. Born J, Fehm HL (1998) Hypothalamus-pituitary-adrenal activity during human sleep: a coordinating role for the limbic hippocampal system. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 106:153-163
14. Born J, Lange T, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Fehm HL (2002) Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat Neurosci* 5:514-6
15. Brandenberger G, Follenius M, Muzet A, Simeoni M, Reinhardt B (1984) Interactions between spontaneous and provoked cortisol secretory episodes in man. *J Endocrinol Metab* 59:406-411

16. Chang FC, Opp MR (2001) Corticotropin-releasing hormone (CRH) as a regulator of waking. *Neurosci Biobehav Rev* 25:445-453
17. Cuneo RC, Espiner EA, Nicholls MG, Yandle TG, Livesay JH (1987) Effect of physiological effects of atrial natriuretic peptide on hormone secretion: Inhibition of angiotensin-induced aldosterone secretion and rennin release in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 65:765-772
18. Cunningham ET, Sawchenko PE (1991) Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin. *Trends Neurosci* 14:406-411
19. Dayanithi G, Antoni FA (1990) Atriopeptins are potent inhibitors of ACTH secretion by rat anterior pituitary cells in vitro: involvement of the atrial natriuretic factor receptor domain of membrane bound guanylyl cyclase. *J Endocrinol* 125: 39-44
20. De Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H (1991) A rapid and potent natriuretic response in intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 28:89-94
21. Engler D, Redei E, Kola I (1999) The corticotropin-release inhibitory factor: a review of the evidence for the existence of inhibitory as well as stimulatory hypophysiotropic regulation of adenocorticotropin secretion and biosynthesis. *Endocrinol Rev* 20:460-500
22. Ermisch A, Ruhle HJ, Kretschmar R, Baethmann A (1991) On the blood-brain barrier to peptides: specific binding of atrial natriuretic peptide in vivo and in vitro. *Brain Res* 554:209-216
23. Fehm HL, Perras B, Smolnik R, Kern W, Born J (2000) Manipulating neuropeptidergic pathways in humans: A novel approach to neuropharmacology? *Eur J Pharmacol* 405:43-54

24. Fink G, Dow RC, Casley D, Johnston CI, Lim AT, Copolov DL, Bennie J, Carrol S, Dick H (1991) Atrial natriuretic peptide is a physiological inhibitor of ACTH release: evidence from immunoneutralization in vivo. *J Endocrinol* 131: R9-12
25. Foresta C, Caretto A, Mioni R, Betterle C, Scandellari C (1988) Evidence of immunoreactive human atrial natriuretic peptides in human anterior pituitary cells. *Horm Metab Res* 20:376-377
26. Franci CR, Ansimo-Franci JA, McCann SM (1992) The role of endogenous atrial natriuretic peptide in resting and stress-induced release of corticotropin, prolactin, growth hormone and thyroid stimulating hormone. *Proc Natl Acad U S A* 89:11391-11395
27. Friess E, Wiedemann K, Steiger A, Holsbroer F. (1995) The hypothalamic-pituitary-adrenocortical system and sleep in man. *Neuroimmunol* 5: 111-25
28. Fujio N, Ohashi M, Nawata H, Kato K, Ibayashi H, Kangawa K, Matsuo H (1986) Alpha-human atrial natriuretic polypeptide reduces the plasma arginine vasopressin concentration in human subjects. *Clin Endocrinol* 25:181-187
29. Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ (1982) Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by Vasopressin. *Nature* 237:398-898
30. Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J, McCann SM (1997) Atrial natriuretic peptide in brain and pituitary gland. *Physiol Rev* 77:465-515
31. Gutkowska J, Nemer M (1989) Structure, expression and function of atrial natriuretic factor in extra-atrial tissues. *Endocr Rev* 10:519-536



32. Hashimoto K, Hattori T, Suemaru S, Sugawara M, Takao T, Kageyama J, Ota Z (1987) Atrial natriuretic peptide do not affect corticotropin-releasing-factor-, arginine vasopressine- and angiotensin II-induced adrenocorticotropic hormone release in vivo or in vitro. *Regul Pept* 17:53-60
33. Holsboer F, von Bardeleben U, Buller R, Heuser , Steiger A (1987) Stimulation response to Corticotropin releasing factor (CRH) in patients with depression, alcoholism, and panic disorder. *Horm Metab Res Suppl* 16:80-88
34. Huang W, Lee D, Yang Z, Copolov DL, Lim AT (1992) Norepinephrine stimulates immunoreactive (ir) atrial natriuretic peptide (ANP) secretion and pro-ANP mRNA expression from rat hypothalamic neurons in culture: effect of  $\alpha$ 2-adrenoceptors. *Endocrinology* 130:2426-8
35. Ibanez-Santos J, Tsagarakis S, Rees LH, Besser GM, Grossmann A (1990) Atrial natriuretic peptides inhibit the release of corticotropin-releasing factor-41 from the rat hypothalamus in vitro. *J Endocrinol* 126:223-228
36. Iitake K, Share L, Crofton JT, Brooks DP, Ouchi Y, Blaine EH (1986) Central atrial natriuretic factor reduces vasopressin secretion in the rat. *Endocrinology* 119:438-440
37. Inagami K (1989) Atrial natriuretic factor (Minireview) *J Biol Chem* 264:3043-3046
38. Itoh H, Nakao K, Katsuura G, Morii N, Yamada T, Shiono S, Sakamoto M, Sugawara A, Saito Y, Eigyo M (1986) Possible involvement of central natriuretic polypeptide in regulation of hypothalamo-pituitary-adrenal axis in unconscious rats. *Neurosci Lett* 69:254-258

39. Jessop DS (1999) Review: Central non-glucocorticoid inhibitors of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J Endocrinol* 160:169-180
40. Kellner M, Wiedemann K, Holsboer F (1992) Atrial natriuretic factor inhibits the CRH-stimulated secretion of ACTH and cortisol in man. *Life Sci* 50:1835-1842
41. Kellner M, Herzog L, Holsboer F, Wiedemann K (1995) Circadian changes in the sensitivity of the corticotropin-releasing-hormone stimulated HPA system after arginine vasopressin and atrial natriuretic hormone in human male controls. *Psychoneuroendocrinology* 20:515-524
42. Kentsch M, Lawrenz R, Ball P, Gerzer M, Müller-Esch G (1992) Effects of atrial natriuretic factor on anterior pituitary hormone secretion in normal men. *Clin Investig* 70:549-555
43. King MS, Baertschi AJ (1989) Physiological concentrations of atrial natriuretic factors with intact N-terminal sequences inhibit corticotropin-releasing factor-stimulated adrenocorticotropin secretion from cultured anterior pituitary cells. *Endocrinol* 124:286-292
44. Kurtz A, Della Bruna R (1986) Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a c-GMP mediated process. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4769-4773
45. Levin ER, Frank HJ, Weber MA, Ismail M, Mills S (1987) Studies of the penetration of blood brain barrier by atrial natriuretic factor. *Biochem Biophys Res Commun* 147:1226-1231
46. Levin ER, Gardner DG, Samson WK (1998) Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 339:321-328

47. Lupien SJ, Nair NP, Briere S, Maheu F, Tu MT, Lemay M, McEwen BS, Meaney MJ (1999) Increased Cortisol levels and impaired cognition in human aging: implication for depression and dementia in later life. *Rev Neurosci* 10:117-139
48. Mantyh CR, Kruger L, Brecha NC, Mantyh PW (1987) Localization of specific binding sites for atrial natriuretic factor in the central nervous system of rat, guinea pig, cat and human. *Brain Res* 412:329-342
49. Martin CR 1985 Adrenocorticotropin and corticotropin-releasing hormones. In *Endocrine Physiology*, 1. Aufl. 252-269, Oxford university Press, Inc New York
50. McEwen BS From molecules to mind. Stress, individual differences and the social environment (2001) *Acad Sci* 935: 42-49
51. McEwen BS (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain res* 886:172-189
52. McEwen BS (2003) Mood disorders and allostatic load. *Biol Psychiatry* 54:200-207
53. Nakamura T, Ichikawa S (1988) Plasma levels of atrial natriuretic peptide in patients with borderline and essential hypertension. *Tohoku J Exp Med* 154:205-213
54. Nissen R, Gutkowska J, Renaud LP (1989) Release of atrial natriuretic factor from intact and hypophysectomized rat hypothalamic explants. *J Neuroendocrinol* 1:309-313

55. Nye EJ, Grice JE, Hockings GI, Strakosch CR, Crosbie GV, Walters MM, Torpy DJ, Jackson RV (2001) The insulin hypoglycemia test: hypglycemic criteria and reproducibility. *J Neuroendocrinol* 13:524-530
56. Pacak K, Palkovits M, Kvetnansky R, Yadid G, Kopin IJ, Goldstein DS (2000) Effects of various stressors on in vivo norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and on the pituitary-adrenocortical axis. *Physiol Res Suppl* 1:511-7
57. Perras B, Marshall L, Kohler G, Born J, Fehm HL (1999) Sleep and endocrine changes after intranasal administration of growth hormone-releasing hormone in young and aged humans. *Psychoneuroendocrinology* 24:743-757
58. Pietrowsky R, Struben C, Mole M, Fehm HL, Born J (1996) Brain potential change after intranasal vs. intravenous administration of vasopressin: evidence for a direct nose-brain pathway for peptide effects in humans. *Biol Psychiatry* 39:332-340
59. Pietrowsky R, Thiemann A, Kern W, Fehm HL, Born J (1996) A nose-brain pathway for psychotropic peptides: evidence from a brain evoked potential study with cholecystinin. *Psychoneuroendocrinology* 21:559-572
60. Redei E, Endröczy E (1983) Hypothalamic factor of inhibitory activity on pituitary adrenocortical function. In: Endröczy E, de Wied D, Angelucci L, Scampagnini U (eds) *Developments in Neuroscience: Integrative Neurohumoral Mechanisms*. Elsevier Amsterdam vol 16:377-383
61. Redei E, Ewans CJ (1989) Dual control of corticotropin secretion: Isolation of corticotropin-inhibiting factor. In: Tache Y, Morley JE, Brown MR (eds) *Neuropeptides and Stress*. Springer-Verlag New York pp61-72

62. Richards AM, Nicholls MG (1985) Renal, hemodynamic and hormonal effects of human atrial natriuretic peptide in healthy volunteers. *Lancet* 1 545-549
63. Robertson GL (1977) The regulation of vasopressin function in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 33:333-385
64. Robertson GL. Posterior pituitary (1986) In: Felig P, Baxter JD, Broadus AE, Frohmann LA. *Endocrinol Metab* 2.Aufl 338-385, McGraw-Hill Book Company, New York
65. Robinson IC, Fitzsimmons MD (1993) Vasopressin homeostasis: coordination of synthesis, storage and release. *Regul Pept* 45:225-230
66. Rosmond R (2003) Stress induced disturbances of the HPA axis: a pathway to Type 2 diabetes? *Med Sci Monit* 9:RA35-RA39
67. Salata RA, Jarett DB, Berbalis AG (1988) Vasopressin stimulation of adrenocorticotropin hormone (ACTH) in humans. *J Clin Invest* 81:766-774
68. Samson WK (1985) Atrial natriuretic factor inhibits dehydration and hemorrhage-induced vasopressin release. *Neuroendocrinology* 40:277-279
69. Sapolsky RM (1999) Glucocorticoids, stress and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp Gerontol* 34:721-732
70. Seemann TE, Robbins RJ (1994) Aging and hypothalamic-pituitary-adrenal response to challenge in humans. *Endocr Rev* 15:233-260
71. Seemann TE, McEwen BS, Rowe JW, Singer BH (2001) Allostatic load as marker of cumulative biological risk: MacArthur studies of successful aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4770-4775

72. Seyle H (1956) *The stress of life*. McGraw-Hill, New York
73. Shibasaki T, Naruse M, Naruse K, Yamauchi N, Kim YS, Masuda A, Imaki A, Demura H, Ling N, Inagami T, Shizume K (1988) Effect of sodium ion on atrial natriuretic factor release from the rat hypothalamic fragments. *Life Sci* 42:1173-1180
74. Späth-Schwalbe E, Fehm HL, Born J, Pfeiffer EF (1987) Combined corticotropin-releasing hormone-vasopressin test: a new test for the evaluation of the pituitary adrenal system. *Horm Metab Res* 19:665-666
75. Späth-Schwalbe E, Piroth L, Pietrowsky R, Born J, Fehm HL (1988) Stimulation of the pituitary adrenocortical system in man by cerulein, a cholecystkinin-8-like peptide. *Clin Physiol Biochem* 6:316-320
76. Späth-Schwalbe E, Uthgenannt D, Körting N, Fehm HL, Born J (1994) Sleep and wakefulness affect the responsiveness of the pituitary-adrenocortical axis to arginine vasopressin in humans. *Neuroendocrinology* 60:544-548
77. Steiger A (2002) Sleep and the hypothalamo-pituitary-adrenocortical system. *Sleep Med Rev* 6:125-38
78. Takao T, Hashimoto K, Ota Z (1988) Effect of atrial natriuretic peptide on acetylcholine-induced release of corticotropin-releasing factor from rat hypothalamus in vitro. *Life Sci* 42:1199-1203
79. Tan TT, Yang Z, Huang W, Lim AT (1994) ANF(1-28) is a potent suppressor of proopiomelanocortin (POMC) mRNA but a weak inhibitor of beta EP-LI release from AtT-20 cells. *J Endocrinol* 143:R1-R4

80. Tanaka I, Misons KS, Inagami T (1984) Atrial natriuretic factor in rat hypothalamus, atria and plasma: determination by specific radioimmunoassay. *Biochem Biophys Res Commun* 124:663-668
81. Tanaka I, Inagami T (1986) Release of immunoreactive atrial natriuretic factor in rat hypothalamus in vitro. *Eur J Pharmacol* 122:353-355
82. Ur E, Faria M, Tsagarakis S, Anderson JV, Besser GM, Grossmann A (1991) Atrial natriuretic peptide in physiological doses does not inhibit the ACTH or cortisol response to corticotropin-releasing-hormone-41 in normal subjects. *J Endocrinol* 131:163-167
83. Vale WW, Spiess J, Rivier C, Rivier J (1981) Characterisation of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates the secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213(4514):1394-1397
84. Weber-Hamann B, Hentschel F, Kniest A, Deuschle M, Colla M, Lederbogen F, Heuser I (2002) Hypercortisolemic depression is associated with increased intraabdominal fat. *Psychosom Med* 64:274-277
85. Weidmann P, Hasler L (1986) Blood levels and renal effects of atrial natriuretic peptide in normal man. *J Clin Invest* 77:734-742
86. Weidmann P, Saxenhofer H, Shaw SG, Ferrier C (1989) Atrial natriuretic peptide in man. *J Steroid Biochem* 32:229-241
87. Weitzmann ED, Fukushima D, Nogueira C, Roffwarg H, Gallagher TF, Hellmann L (1971) Twentyfour hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *J Endocrinol Metab* 33:14-22

88. Wiedemann K, Jahn H, Kellner M (2000) Effects of natriuretic peptides upon hypothalamp-pituary-adrenocortical system activity and anxiety behaviour. *Exp Clin Endocrinol* 108: 5-13
89. Yang XJ, Kow LM, Funabashi T, Mobbs CV (1999) Hypothalamic Glukose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes* 48:1763-1772
90. Yehuda R (2002) Current status of cortisol findings in post-traumatic stress disorder. *Psychiatr Clin North Am* 25:233-260



## Lebenslauf

Birte Behn  
geb. am 27.10.1976  
in Düsseldorf

### SCHULE UND STUDIUM

---

1983-1987	Grundschule Düsseldorf
1987-1989	Anette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium, Düsseldorf
1989-1996	Gymnasium Theresianum, Mainz
1996	Abitur
1996-2002	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität Lübeck
	03/1999    Physikum
	09/2000    1. Staatsexamen
	03/2002    2. Staatsexamen
2002 -2003	Praktisches Jahr an der Ludwig-Maximilian-Universität, München
	Wahltertial in der kinder- und jugendpsychiatrischen Klinik, Heckscher Klinik München; Innere Medizin, Medizinische Klinik II, Städt. Krankenhaus München-Neuperlach; Chirurgie, Städt. Krankenhaus München-Harlaching
	10/2003    3. Staatsexamen

## TÄTIGKEIT / AUSBILDUNG

---

01/2004 Tätigkeit als Ärztin im Praktikum / seit 10/2004 als Assistenzärztin in der Hochschulambulanz für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

## DISSERTATION

---

06/2001 Beginn der Versuchsreihe zum Thema „Atriales Natriuretisches Peptid (ANP) hemmt die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse nach intranasaler Applikation bei gesunden Männern“.

03/2003 Poster auf dem 47. Symposium der Deutschen Endokrinerologischen Gesellschaft in Köln

09/2004 Veröffentlichung in „The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism“ 89(9) 2004

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Boris Perras aus der Med. Klinik I. Ich danke für die Anleitung und Betreuung des praktischen Teils meiner Arbeit, die Hilfe bei der Literatursauswahl, für die Korrektur des Manuskripts und viele, viele e-mails.

Herrn Prof. Dr. med. Horst Lorenz Fehm, Direktor der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein – Campus Lübeck, danke ich für die Vergabe des Dissertationsthemas und die Überlassung von Arbeitsplatz und Materialien.

Prof. Dr. J. Born, dem Direktor des Instituts für Neuroendokrinologie, danke ich für viele hilfreiche Kommentare und die statistische Beratung.

Christiane Zinke aus dem Klinischen Labor der Klinik für Innere Medizin danke ich für die praktische Hilfe und Beratung in labortechnischen Fragen und für die Durchführung der zahlreichen Hormonbestimmungen.

Ich danke dem Institut für Klinische Chemie sowie dem Institut für Hämatologie für die Messung der Proben, die ich sogar im Bereitschaftsdienst an Wochenenden abgeben durfte.

Christian Metz danke ich für die Unterstützung bei den Versuchen und der Entstehung der Arbeit.

Und natürlich danke ich meinen Eltern, die mir das Studium und diese Dissertation ermöglicht haben.