

Aus dem Institut für Neuroendokrinologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. Jan Born

---

**Die Wirkung intranasaler Gabe von Hypocretin-1 vor dem Nachtschlaf  
auf Schlafarchitektur, Nahrungsaufnahme  
und metabolische Parameter beim Menschen**

*Eine Untersuchung an gesunden Probanden*

Inauguraldissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von  
Jakob Slemeyer  
aus Karlsruhe

Lübeck, 2010

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. soc. Jan Born

2. Berichterstatter/Berichterstatterin:

Prof. Dr. med. Jürgen Potratz

Tag der mündlichen Prüfung:

14.04.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

14.04.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Stand der Forschung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Das Hypocretinsystem.....	1
1.1.1. <i>Entdeckung und Molekülstruktur</i> .....	1
1.1.2. <i>Die Hypocretin-Rezeptoren und ihre Verteilung im ZNS</i> .....	2
1.1.3. <i>Projektionen hypocretinerger Bahnen im ZNS</i> .....	4
1.2. Die Rolle des Hypocretinsystems in Schlaf-Wach-Regulation und Metabolismus.....	5
1.2.1. <i>Die physiologischen Wirkungen von Hypocretin auf Schlaf-Wach-Rhythmus und Aktivierung</i> .....	5
1.2.2. <i>Die physiologischen Wirkungen von Hypocretin auf metabolische Parameter</i> .....	9
1.3. Schlaf und Metabolismus: Hypocretin als möglicher Mediator des Zusammenhangs.....	13
1.4. Intranasale Gabe von Neuropeptiden.....	16
1.5. Fragestellung.....	18
<b>2. Probanden und Methoden.....</b>	<b>20</b>
2.1. Versuchspersonen.....	20
2.2. Versuchsablauf.....	20
2.3. Erhobene Daten.....	23
2.3.1. <i>EEG-Aufzeichnung</i> .....	23
2.3.2. <i>Blutentnahmen</i> .....	24
2.3.3. <i>Testfrühstück</i> .....	26
2.4. Statistische Auswertung.....	27
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>28</b>
3.1. Schlaf-EEG.....	28

3.2.	Blutproben .....	30
3.2.1.	<i>Blutzucker</i> .....	30
3.2.2.	<i>Insulin</i> .....	31
3.2.3.	<i>Leptin</i> .....	32
3.2.4.	<i>ACTH</i> .....	34
3.2.5.	<i>Cortisol</i> .....	35
3.2.6.	<i>Wachstumshormon</i> .....	35
3.4.	Testfrühstück .....	38
3.5.	Behaviorale Tests .....	39
3.5.1.	<i>10-Punkte-Rating</i> .....	39
3.5.2.	<i>EWL-K</i> .....	39
3.5.3.	<i>Bipolar-Skala</i> .....	41
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>42</b>
4.1.	Einfluss der Hypocretin-1-Gabe auf Schlaf-Wach-Rhythmus und Aktivierung.....	41
4.2.	Einfluss der Hypocretin-1-Gabe auf metabolische Parameter .....	42
4.3.	Einfluss der Hypocretin-1-Gabe auf Hunger, Durst und Nahrungsaufnahme.....	44
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>56</b>
7.1.	Aufklärungsbogen .....	55
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>58</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Beispielhafter Ablauf der Schlafstadien .....	6
<b>Abb. 2:</b>	Integration des Hypocretinsystems in die Regulation der Nahrungsaufnahme .....	10
<b>Abb. 3:</b>	Darstellung potenzieller Wechselwirkungen zwischen Schlaf, Adipositas und Diabetes .....	14
<b>Abb. 4:</b>	Die Rolle des Hypocretinystems in der Detektion und Regulation von Schlaf und Metabolismus.....	15
<b>Abb. 5:</b>	Versuchsablauf im Überblick .....	21
<b>Abb. 6:</b>	Positionierung der Elektroden zur polysomnografischen Schlafaufzeichnung.....	23
<b>Abb. 7:</b>	Darstellung des prozentualen S4 Anteils.....	29
<b>Abb. 8:</b>	Darstellung der SWS-Latenz. ....	29
<b>Abb. 9:</b>	Verlauf der Blutzuckerwerte.....	30
<b>Abb. 10:</b>	Verlauf des Insulinspiegels.....	31
<b>Abb. 11:</b>	Verlauf des Leptinspiegels .....	32
<b>Abb. 12:</b>	Verlauf des Leptinspiegels der Männer.....	33
<b>Abb. 13:</b>	Verlauf des Leptinspiegels der Frauen. ....	33
<b>Abb. 14:</b>	Verlauf des ACTH-Spiegels .....	34
<b>Abb. 15:</b>	Verlauf des Cortisolspiegels.....	35
<b>Abb. 16:</b>	Verlauf des Wachstumshormon-Spiegels.....	36

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b>	Zusammenstellung des Testfrühstücks .....	26
<b>Tab. 2:</b>	Dauer der Schlafstadien unter Hypocretin- und Placebobedingungen .....	28
<b>Tab. 3:</b>	Ergebnisse der Auswertung der Blutosmolalität .....	37
<b>Tab. 4:</b>	Ergebnisse der Analyse des Sammelurins .....	37
<b>Tab. 5:</b>	Relevante Ergebnisse des Testfrühstücks.....	38
<b>Tab. 6:</b>	Durchschnittliche Punktzahl für Hunger, Durst und Müdigkeit unter Hypocretin- und Placebobedingungen.....	39
<b>Tab. 7:</b>	Mittelwerte der EWL-K unter Hypocretin- und Placebobedingungen.....	40
<b>Tab. 8:</b>	Mittelwerte der Bipolarskala unter Hypocretin- und Placebobedingungen .....	41

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AgRP	Agouti-Related-Peptide
aS	analytische Sensitivität
BMI	Body-Mass-Index
CART	Cocain- and Amphetamin-related Transcripts
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
Da.	Dalton
EEG	Elektroenzephalogramm
EMG	Elektromyogramm
EOG	Elektrookulogramm
Hcr	Hypocretin
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse
HLA	Human Leukocyte Antigene
MCH	Melanin-concentrating Hormone
m-RNA	Messenger Ribonucleic Acid
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
MW	Mittelwert
NPY	Neuropeptid Y
POMC	Proopiomelanocortin
REM	Rapid-eye-movement
RIA	Radioimmunoassay
SEM	Standardfehler
SSRI	selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (Selective Serotonin-Reuptake-Inhibitor)
SWS	Slow Wave Sleep
TRH	Thyrotropin Releasing Hormone
VK	Variationskoeffizient
WGA-HRP	Wheat Germ Agglutinin-horseradish Peroxidase

## 1. Einleitung und Stand der Forschung

Schlaf ist ein Grundbedürfnis des Menschen. Obwohl der Mensch ein Drittel seines Lebens schlafend verbringt, ist seine Funktion immer noch umstritten und nur in Ansätzen verstanden. Mittlerweile wird Schlaf nicht nur als passiver Zustand der Erholung aufgefasst, sondern als adaptiver plastischer Prozess der kognitiven, immunologischen und metabolischen Gedächtnisbildung. So verstärkt Schlaf z. B. die Antikörperantwort nach einer Hepatitis A-Impfung (Lange et al., 2003). Der Einfluss des Schlafes auf die Konsolidierung kognitiver Gedächtnisinhalte ist vielfach belegt (Cipolli, 1995, Plihal und Born, 1997, Walker und Stickgold, 2004, Diekelmann und Born, 2010).

Dem hypothalamisch exprimierten Neuropeptid Hypocretin-1, das im Tierversuch die Aktivierung und Nahrungsaufnahme steigert, wird gegenwärtig eine große Bedeutung als Mittler zwischen Schlaf-Wach-Regulation und metabolischen Vorgängen zugeschrieben. Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkung von Hypocretin-1 auf Schlafarchitektur, Essensaufnahme und metabolische Parameter. Bevor auf die Fragestellung genauer eingegangen wird, folgt zunächst ein Überblick über das Hypocretinsystem, seine Wirkungen auf Schlaf und Metabolismus sowie deren Interaktionen.

Hypocretin-1 entfaltet seine Wirkungen vorwiegend im zentralen Nervensystem. Die intranasale Gabe von Hypocretin-1 stellt einen eleganten und effektiven Weg zur Beeinflussung des Hypocretinsystems dar, auf den im letzten Teil der Einleitung genauer eingegangen wird.

### 1.1. Das Hypocretinsystem

#### *1.1.1. Entdeckung und Molekülstruktur*

Im Jahr 1998 entdeckten de Lecea und seine Mitarbeiter, bei der Suche nach neuen Hormonen mit Einfluss auf die Gewichtsregulation und Nahrungsaufnahme im Hypothalamus, ein neues Präprohormon mit struktureller Ähnlichkeit zu dem gastrointestinalen Hormon Sekretin (de Lecea et al., 1998). Sie nannten es Präprohypocretin und die aus ihm entstehenden Peptide Hypocretin-1 und Hypocretin-2. Nur einen Monat später entdeckten Yanagisawa und Mitarbeiter (Sakurai et al., 1998) auf der Suche nach Liganden für einen

Orphan-G-Rezeptor zwei Peptide, die sie aufgrund ihrer appetitsteigernden Wirkung bei zentraler Applikation im Tiermodell Orexin A und Orexin B (nach dem griechischen Wort orexis = Appetit) nannten. Seitdem findet man in der Literatur die Namen Orexin A/B bzw. Hypocretin-1/2 für ein und dasselbe Hormon.

Hypocretin-1 besteht aus 33 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 3562 Dalton (Da.). Es hat einen N-terminalen Polyglutamyl-Rest, C-terminal eine Amidation und enthält zwei Disulfidbrücken. Das schwächer wirksame Hypocretin-2 ist mit 28 Aminosäuren etwas kürzer und enthält keine Disulfidbrücken. Auch das Hypocretin-2 besitzt eine C-terminale Amidation und hat ein Molekulargewicht von 2937 Da. Beide gehen aus dem Präprohypocretin hervor. Ihre Aminosäuren-Sequenz stimmt zu 46% überein (Sakurai et al., 1998). Mittlerweile wird das Hypocretinsystem mit vielen verschiedenen neurophysiologischen Prozessen in Verbindung gebracht. So wird seine Rolle in Bezug auf Vigilanz, Nahrungsaufnahme, Emotionen und Suchterkrankungen erforscht. Auch wurde ein defizientes Hypocretinsystem als Ursache der Narkolepsie entdeckt.

### *1.1.2. Die Hypocretin-Rezeptoren und ihre Verteilung im ZNS*

Mit der Entdeckung von Hypocretin-1 und 2 entdeckten Sakurai und seine Mitarbeiter auch die zwei Hypocretin-Rezeptoren Hcrt1 und Hcrt2. Sie gehören zu der Gruppe der G-Protein gekoppelten Orphan-Rezeptoren und haben eine große Ähnlichkeit mit anderen Neurorezeptoren wie z. B. den Rezeptoren von Neuropeptid Y (NPY) und Thyreotropin Releasing Hormon (TRH). Die Aminosäuresequenz stimmt bei Hcrt1 und Hcrt2 zu 64 % überein. Der Hcrt1-Rezeptor hat eine 2 bis 3-fach höhere Affinität zu Hypocretin-1 als zu Hypocretin-2. Der Hcrt2-Rezeptor hingegen bindet Hypocretin-1 und 2 mit gleicher Affinität. Die Aminosäuresequenz von Hypocretin-Rezeptoren in Ratte und Mensch stimmt zu 94 % bei dem Hcrt1-Rezeptor und zu 95 % bei dem Hcrt2-Rezeptor überein, was zeigt, dass die Rezeptorgene über Speziesgrenzen hoch konserviert sind (Sakurai et al., 1998).

Mit Hilfe von In-situ-Hybridisierung gelang es, die verschiedenen Verteilungsmuster der m-RNA (messenger ribonucleic acid) der Hypocretin-Rezeptoren 1 und 2 zu analysieren. Die zwei Hypocretin-Rezeptortypen zeigen eine erstaunlich unterschiedliche Verteilung im ZNS. Schon im Hypothalamus, der die höchste Dichte an hypocretinergen Neuronen besitzt, zeigt sich ein differenziertes Verteilungsmuster. Eine hohe Anzahl an Hcrt1-



Rezeptoren befindet sich im Nucleus ventromedialis. Etwas geringere Konzentrationen zeigen die Nuclei preoptici, lateroanteriore und dorsomediale Nuclei sowie die Area hypothalamica posterior. Hcrt2-Rezeptoren werden vorwiegend im Nucleus paraventricularis exprimiert. Niedrigere bis mittlere Mengen befinden sich im Nucleus ventromedialis und dorsomedialis und in der Area hypothalamica lateralis und posterior (Trivedi et al., 1998, Marcus et al., 2001). Bemerkenswert ist hier der starke Unterschied in den Verteilungsmustern von Hcrt1- und Hcrt2-Rezeptoren im Nucleus ventromedialis und im Nucleus paraventricularis. Die Nuclei paraventricularis, ventromedialis und arcuatus gehören zu den Sättigungszentren im Hypothalamus und hemmen die Nahrungsaufnahme. Dem gegenüber steht der laterale Hypothalamus als Hungerzentrum, der die Nahrungsaufnahme stimuliert. So führen bei Ratten Läsionen des medialen Hypothalamus zu starkem Übergewicht und Läsionen des lateralen Hypothalamus zur Anorexie. (Levitt und Teitelbaum, 1975). Die differenzierte Verteilung von Hcrt1- und Hcrt2-Rezeptoren in diesen Regionen spricht für eine Beteiligung des Hypocretinsystems an der Regulation der Nahrungsaufnahme.

Auch außerhalb des Hypothalamus sind Hypocretinrezeptoren in vielen Regionen des Gehirns nachweisbar. Die m-RNA von Hypocretinrezeptoren wurde in Regionen, wie dem cerebralen Kortex, dem Hippocampus, dem Nucleus paraventricularis des Thalamus, den dorsalen Raphe-Kernen und dem Locus coeruleus entdeckt (Marcus et al., 2001, Trivedi et al., 1998). Hippocampus und basale Strukturen des Kortex sind Regionen, die bekanntermaßen wichtig sind für Lernprozesse, Aufmerksamkeit und Emotionen (McGhaugh et al., 1996). Weitere Einblicke erlaubt die Beobachtung von Hypocretinrezeptor-Knock-out-Mäusen. Hcrt1-Rezeptor Knock-out-Mäuse haben nur leichte Störungen des Schlaf-Wach-Rhythmus. Hcrt2-Rezeptor Knock-out-Mäuse hingegen zeigen einen narkoleptischen Phänotyp mit schwerwiegender Beeinträchtigung des Schlaf-Wach-Rhythmus. Folglich scheint der Hcrt2-Rezeptor in der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus eine weit größere Rolle zu spielen als der Hcrt1-Rezeptor, auch wenn Mäuse, denen beide Rezeptoren fehlen, noch schwerere Störungen des Schlaf-Wach-Rhythmus aufweisen, als wenn nur der Hcrt2-Rezeptor ausgeschaltet wird (Willie et al., 2001 und 2003).

### *1.1.3. Projektionen hypocretinerges Bahnen im ZNS*

Mithilfe immunhistochemischer Techniken gelang es, die Verteilung hypocretinerges Fasern im Gehirn näher zu untersuchen. Hypocretinerges Neurone kommen ausschließlich im dorsalen und lateralen Hypothalamus vor, Regionen, die bekanntermaßen für die Steuerung der Nahrungsaufnahme und des Energiehaushaltes wichtig sind (Sarkurai et al., 1998, de Lecea et al., 1998, Woods et al., 1998). Die Axone der hypocretinerges Neurone strahlen in sehr viele Bereiche des Gehirns, wie in den cerebralen Kortex, den Thalamus, den Hypothalamus oder in den Hirnstamm aus und haben fast immer exzitatorische Wirkung.

Eine hohe Dichte an hypocretinhaltigen Fasern konnte in monaminergen Zentren wie dem Locus coeruleus (Noradrenalin) und den Raphe-Kernen (Serotonin) nachgewiesen werden (Peyron et al., 1998, Date et al., 1999, Hagan et al., 1999). Serotonerges und noradrenerges Systeme spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei Bewegung, Vigilanz und der Kontrolle des Muskeltonus. (Jacobs, 1991, Kiashchenko et al., 2001). Weitere Projektionen befinden sich im Nucleus suprachiasmaticus, einem wichtigen Taktgeber des Schlafrythmus, und im Nucleus arcuatus, in dem Leptin und Ghrelin wichtige Wirkungen auslösen (Woods et al., 1998, Green et al., 2007). Im Nucleus arcuatus haben hypocretinerges Neurone auch Kontakt zu Neuropeptid Y (NPY)-haltigen Neuronen, die appetitstimulierende Wirkung haben (Horvath et al., 1999). Über den dorsalen motorischen Vagus-Kern hat das Hypocretinsystem Einfluss auf die Regulation von autonomen Körperfunktionen (Peyron et al., 1998, Date et al., 1999).

## 1.2. Die Rolle des Hypocretinsystems in Schlaf-Wach-Regulation und Metabolismus

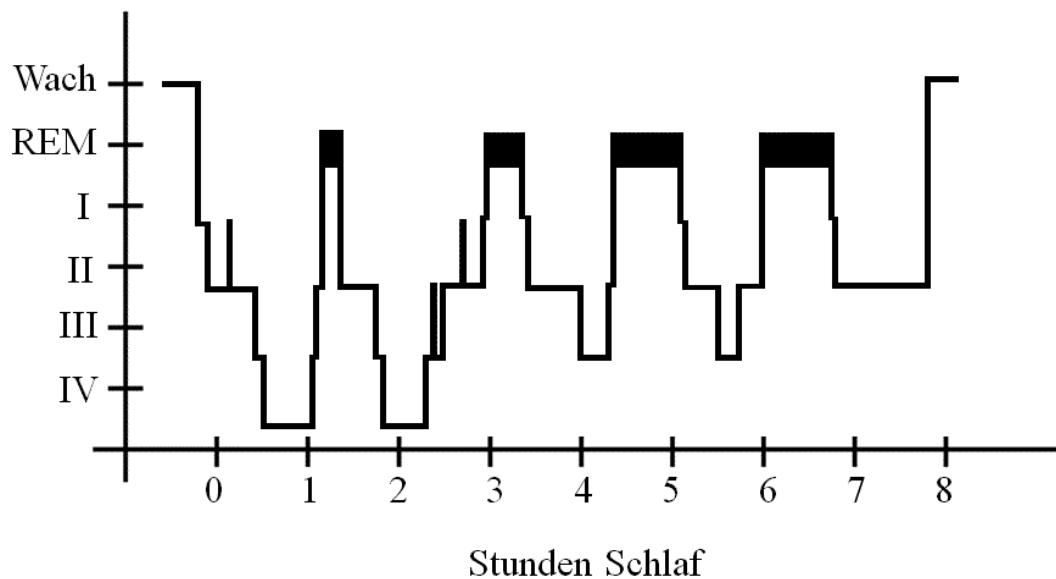
### 1.2.1. *Die physiologischen Wirkungen von Hypocretin auf Schlaf-Wach-Rhythmus und Aktivierung*

Der Schlaf-Wach-Rhythmus des Menschen unterliegt einer 24-stündigen Periodik, die durch den Nucleus suprachiasmaticus des Hypothalamus generiert wird (Green et al., 2007). Ca. ein Drittel des Tages verbringt der Mensch im Schlaf. Der Schlaf ist dabei kein einheitlicher Prozess. Durch Erfassung der elektrischen Hirnaktivität (Elektroenzephalogramm, EEG), der elektrischen Muskelaktivität (Elektromyogramm, EMG), sowie Registrierung der Augenbewegungen (Elektrookulogramm, EOG), genannt Polysomnographie, lässt sich der Schlaf nach Rechtschaffen und Kales (1968) in fünf Stadien einteilen. Beurteilt werden jeweils Epochen von 30 Sekunden Länge.

Charakteristisch für den Wachzustand ist eine EEG-Frequenz von 8 bis 13 Hz mit recht flacher Amplitude, auch Alpha genannt. Die Amplitude des EMG ist dabei relativ hoch, und es können meist schnelle Augenbewegungen beobachtet werden. Bei Eintreten in das Schlafstadium 1 verlangsamt sich die Frequenz des EEGs auf Werte zwischen 2 bis 7 Hz. Die Amplitude des EMG ist niedriger als im Wachzustand, und es treten rollende Augenbewegungen auf. Charakteristisch für das Stadium 2 sind Schlafspindeln und K-Komplexe. Der Muskeltonus im EMG nimmt gegenüber dem Stadium 1 weiter ab. Stadium 1 und 2 werden als leichter Schlaf bezeichnet. In den beiden Tiefschlafstadien 3 und 4, auch Slow-Wave-Sleep (SWS) genannt, zeigen sich langsame Delta-Wellen. Bestehen 20 bis 50 % einer Epoche aus Delta-Wellen, liegt Stadium 3 vor. Sind es mehr als 50 %, wird die Epoche dem Stadium 4 zugeordnet. In den Tiefschlafstadien wird die Amplitude des EMG noch niedriger und es treten keine Augenbewegungen auf. Die Stadien 1 bis 4 werden auch als „non-rapid-eye-movement-sleep“ (NREM-Schlaf) bezeichnet. Das wichtigste Kriterium für „rapid-eye-movement-sleep“ (REM-Schlaf) sind die schnellen Augenbewegungen im EOG. Des Weiteren zeigt sich eine gemischte, wachähnliche EEG-Aktivität vorwiegend in einer Frequenz von 2 bis 7 Hz. Auch Alpha-Wellen können auftreten. Die Amplitude des EMG ist hier niedriger als in allen anderen Schlafstadien.

In der Nacht kommt es 4 bis 6-mal zur periodischen Wiederholung von ca. 90-minütigen Zyklen, bestehend aus NREM- und REM-Schlaf. Dabei überwiegt in der ersten Nachthälfte der SWS und in der zweiten Nachthälfte der REM-Schlaf. In Abbildung 1 ist exemplarisch ein möglicher Ablauf der Schlafstadien dargestellt.

## Schlafstadien



**Abb. 1:** Beispielhafter Ablauf der Schlafstadien

Mehrere Studien beschreiben ein charakteristisches zirkadianes Aktivitätsmuster des Hypocretinsystems. Bei Ratten korreliert die Fos-Expression (ein Marker neuronaler Aktivität) in hypocretinergen Neuronen positiv mit der Wachheit und negativ mit REM- und NREM-Schlaf (Estabrooke et al., 2001). Die Untersuchung des Hypocretinspiegels im Liquor von Affen ergibt ein ähnliches Bild: die höchsten Konzentrationen wurden am Ende der Wachperiode und die niedrigsten nach Abschluss der Schlafperiode gemessen (Zeitzer et al., 2003). Für eine wachheitsfördernde Wirkung von Hypocretin sprechen auch experimentelle Studien. Verabreicht man Ratten zentral Hypocretin-1, reagieren sie mit verstärkter Wachheit, und es kommt zu einer Unterdrückung von REM- und NREM-Schlaf (Hagan et al., 1999). Passend zu diesen Ergebnissen konnte eine Studie an Ratten, Menschen und Hunden zeigen, dass die Gabe von Hcrt1- und Hcrt2-Antagonisten zu verminderter Aufmerksamkeit und Bewegung, gesteigerter Müdigkeit und vermehrtem REM- und NREM-Schlaf führt (Brisbare-Roch et al., 2007).

### *Narkolepsie*

Wie wichtig das Hypocretinsystem für die Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus ist, verdeutlicht die Klinik der Hypocretin-Mangelkrankung Narkolepsie. Neben einer starken chronischen Müdigkeit, die oft zu Schlaf in ungewollten Situationen führt, treten Anfälle

mit plötzlichem Verlust des Muskeltonus mit Bewegungsunfähigkeit auf. Diese sogenannten Kataplexien ereignen sich bei voll erhaltenem Bewusstsein, dauern einige Minuten und werden meist durch starke Emotionen wie Lachen oder Wut des Betroffenen ausgelöst. Viele der Betroffenen leiden zusätzlich unter angsterfüllten hypnagogen Halluzinationen. Ebenfalls auffällig sind die verkürzte Einschlaflatenz und der sehr schnelle Übergang in den REM-Schlaf (Siegel, 2003). Die Kataplexien und die Halluzinationen sind möglicherweise in den Tag verschleppte REM-Schlaf-Anteile, da im REM-Schlaf Halluzinationen und ein Verlust des Muskeltonus physiologisch vorkommen. Scheinbar verursacht der Mangel an Hypocretin eine starke Instabilität der Schlaf-Wach-Regulation mit schnellen Sprüngen zwischen den verschiedenen Zuständen.

Die Erkrankung Narkolepsie wurde als erstes von 1877 von Westphal beschrieben und hat eine Prävalenz von 25 bis 50/100.000 Einwohner (Masuhr und Neumann, 2007). Lange war die Pathogenese der Erkrankung ungeklärt. Entdeckt wurde der Zusammenhang zwischen Hypocretinmangel und Narkolepsie, als die Gruppe um Yanagisawa eine Präprohypocretin-Knock-out-Maus kreierte. Bei der Beobachtung ihres Verhaltens entdeckten sie immer wieder auftretende Perioden von plötzlicher Inaktivität. Nachdem viele andere Ursachen ausgeschlossen wurden, kamen sie zu dem Schluss, dass sie eine narkoleptische Maus kreiert hatten, die immer wieder Phasen von Kataplexie und Schlaf zeigte (Chemelli et al., 1999). Im gleichen Jahr entdeckte eine Forschungsgruppe um Mignot, dass narkoleptische Hunde eine Mutation des Hcrt-2-Rezeptor-Gens aufweisen (Lin et al., 1999). Ursache der Narkolepsie beim Menschen ist der Untergang der hypocretinergen Neurone im lateralen und posterioren Hypothalamus. Mutationen des Hypocretinsystems spielen dabei keine Rolle. Thannickal et al. konnten nachweisen, dass die Anzahl der Hypocretin Neurone in Hirnen von Narkoleptikern um 85 bis 95 % niedriger ist als im Hirn von Gesunden. Direkt benachbarte MCH-Neurone (MCH = Melanin-concentrating hormone) waren in ihrer Anzahl nicht reduziert. (Thannickal et al., 2000). Die Hypocretinkonzentration im Liquor ist bei sehr vielen Narkoleptikern gegenüber Gesunden stark bis nicht mehr nachweisbar erniedrigt. (Ripley et al., 2001, Nishino et al., 2002, Kanbayashi et al., 2002). Es besteht eine starke HLA-Assoziation (human leukocyte antigens). 85 bis 95 % der Narkoleptiker mit Kataplexien sind Träger des HLA Typs DQB1 0602, der nur bei 24 % der Gesunden nachweisbar ist (Oelerup et al., 1990, Mignot et al., 1997). Diese starke Assoziation legt den Verdacht einer autoimmunen Genese der Narkolepsie nahe. Bisher konnte jedoch noch kein spezifischer Antikörper ausfindig gemacht werden.

Narkoleptiker zeigen metabolische Auffälligkeiten. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ihr BMI signifikant erhöht ist, möglicherweise infolge reduzierter körperlicher Aktivität (Schuld et al., 2000, Dahmen et al., 2001, Kok et al., 2003). Eventuell tragen auch die deutlich erniedrigten Leptinspiegel von Narkolepsiepatienten zur Entwicklung des Übergewichts bei (Kok et al., 2002).

Die Therapie der Narkolepsie ist äußerst schwierig. Viele der verwendeten Medikamente haben starke Nebenwirkungen, und die Lebensqualität ist auch bei optimaler Einstellung mit den bekannten Medikamenten oft eingeschränkt. Zur Behandlung der Tagesmüdigkeit werden wach machende Medikamente wie Modafinil, Natrium-Oxybat oder Amphetamine wie Methylphenidat eingesetzt. Mit selektiven Serotonin Reuptake Inhibitoren (SSRI) wie Fluoxetin wird versucht, die Kataplexien zu vermindern (AWMF online, 2008). Bei narkoleptischen Hunden und Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Hypocretin einen positiven Einfluss auf Kataplexie und den Schlaf-Wach-Rhythmus hat (John et al., 2000, Mieda et al., 2004). Auch beim Menschen könnte in Zukunft die Substitution von Hypocretinen eine effektive Behandlungsmöglichkeit der Narkolepsie darstellen (Siegel, 2003).

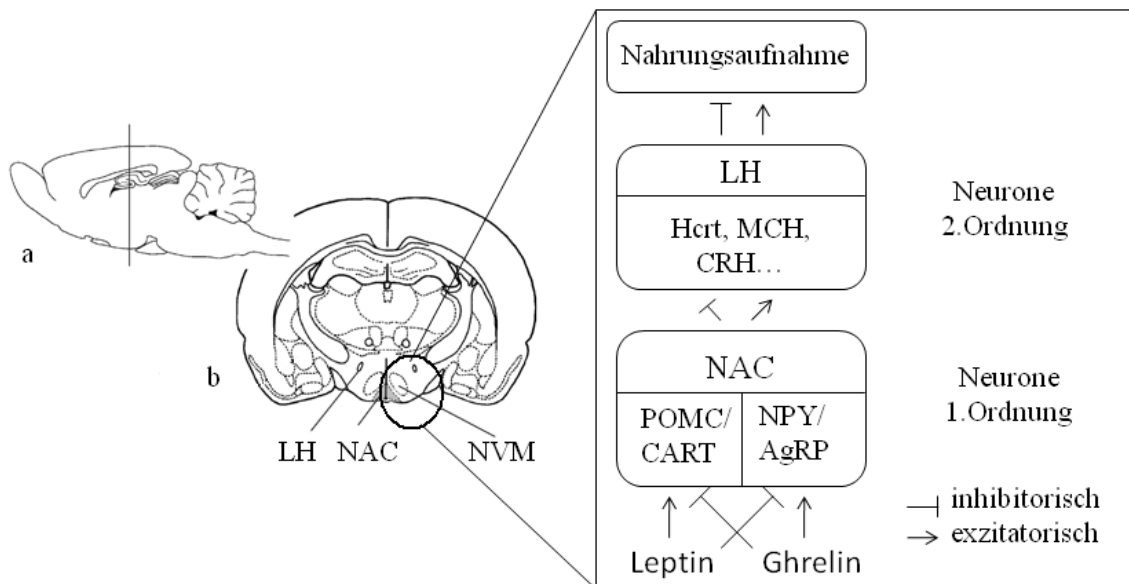
### *1.2.2. Die physiologischen Wirkungen von Hypocretin auf metabolische Parameter*

Die Energiehomöostase des Körpers unterliegt einer komplexen Regulation. Nur so ist es dem Körper möglich, das Körpergewicht über Jahre konstant zu halten. Dabei wird versucht, die Nahrungsaufnahme dem aktuellen Energieverbrauch anzupassen. Sofern dies nicht möglich ist, und die aufgenommene Energiemenge den Verbrauch über- oder unterschreitet, entstehen anabole bzw. katabole Situationen, in denen der Körper die Energiespeicher auffüllt oder entleert. Eine der zentralen Regelgrößen ist Glukose. Der Körper versucht, den Glukosespiegel in engen Grenzen konstant zu halten. Es ist gut belegt, dass Schwankungen der Glukosekonzentration Hunger verursachen bzw. ihn vermindern (Melanson et al., 1999, Schultes et al., 2003). Bereits 1955 postulierte Mayer, dass Glukosekonzentrationen Einfluss auf die Regulation der Nahrungsaufnahme haben, und begründete damit die glukostatische Theorie der Regulation der Nahrungsaufnahme (Mayer, 1955). Eine große Rolle in der Regulation des Glukosehaushaltes besitzt bekanntlich das pankreatische Hormon Insulin. Neben den peripheren Wirkungen auf die Glukoseutilisation überwindet Insulin die Bluthirnschranke und entfaltet (zeigt) dort im ZNS anorexigene Effekte.

Ein weiteres anorexigenes Hormon in der Regulation der Energiehomöostase ist Leptin. Es wird proportional zur Fettmasse von weißen Fettzellen sezerniert und meldet, nach Überwindung der Bluthirnschranke, den Füllungszustand peripherer Energiespeicher an das ZNS (vgl. lipostatische Theorie von Kennedy, 1953). Der Verdacht, dass eine gestörte Leptinproduktion eine Rolle in der Pathogenese der Adipositas besitzt, konnte nicht bestätigt werden. Menschen mit Adipositas haben sogar sehr hohe Leptinspiegel, die aber scheinbar von den zentralen Regulationszentren nicht richtig prozessiert werden können (Zhang et al., 1994, Considine et al., 1996, Schwarz et al., 2000). Die Mechanismen dieser Leptinresistenz sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Es gibt Hinweise, dass das Hypocretinsystem in der Lage ist, die Leptinresistenz positiv zu beeinflussen (Funato et al., 2009).

Eine zentrale Rolle bei der Regulation der Energiehomöostase spielt der laterale und ventromediale Hypothalamus (Schwartz et al., 2000). In diesen Regionen erfolgt die Regulation der Nahrungsaufnahme durch das Zusammenspiel von Hormonen, Energiesubstraten, Neurotransmittern und autonomen Nervenfasern. Leptin, Insulin und das orexigene Hormon Ghrelin, das überwiegend aus dem Magen kommt, regulieren die Aktivität des Nucleus arcuatus des medialen Hypothalamus. Leptin und Insulin inhibieren Neurone des

Nucleus arcuatus, die NPY und Agouti-related-peptide (AgRP) enthalten, und stimulieren Neurone, die Proopiomelanocortin (POMC) und Cocain and Amphetamin-related Transcripts (CART) enthalten (Neurone 1. Ordnung). Ghrelin hat den gegenteiligen Effekt. Die Neurone des Nucleus arcuatus projizieren u.a. in den lateralen Hypothalamus. In diesem werden die Signale der NPY/AgRP- und POMC/CART-Neurone dann gemeinsam mit Umweltfaktoren und anderen endokrinen Signalen verarbeitet und aktivieren oder hemmen Neurone 2. Ordnung. Diese enthalten neben Hypocretin (Hcrt) auch MCH und Corticotropin-releasing hormone (CRH). Sie führen zu einem, dem aktuellen Bedarf angepassten Verhalten bezüglich Nahrungsaufnahme, Aktivität, und Vigilanz (Morton et al., 2006, Adamantidis und de Lecea 2009).



**Abb. 2:** Darstellung einer Lateralansicht (a) und eines Koronarschnitts (b) durch das Hirn einer Ratte. Gezeigt wird der laterale Hypothalamus (LH), der Nucleus arcuatus (NAC) und der Nucleus ventromedialis (NVM). In der Vergrößerung: Integration des Hypocretinsystems in die Regulation der Nahrungsaufnahme. Bearbeitet und stark erweitert nach Kishi und Elmquist, 2005.

Wie beeinflusst Hypocretin nun die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch? Verabreicht man Ratten zentral Hypocretin-1, reagieren sie mit gesteigerter Nahrungsaufnahme (Sakurai et al., 1998, Yamanaka et al., 1999, Edwards et al., 1999). Passend zu dieser Beobachtung wird die Nahrungsaufnahme von Ratten nach zentraler Applikation von Hypocretin-Antikörpern signifikant unterdrückt (Yamada et al., 2000). Auch gegensätzliche Effekte



sind beschrieben. Rhesus-Affen reagieren auf zentrale Hypocretin-1-Gabe mit einer reduzierten Nahrungsaufnahme (Remsey et al., 2005). Vermutlich führen hohe Hypocretinspiegel auch indirekt über gesteigerte Wachheit und vermehrte Bewegung zu gesteigerter Nahrungsaufnahme. Ratten reagieren z. B. auf ein vermindertes Nahrungsangebot und Hunger mit erhöhter Vigilanz und längeren Wachperioden. Beide erhöhen die Wahrscheinlichkeit, Nahrung zu finden (Challet et al., 1997). Dieses Verhalten ist bei transgenen Mäusen ohne hypocretinerge Neurone nicht vorhanden, was zeigt, dass das Hypocretinsystem nötig ist, um das Verhalten einem unterschiedlichen Nahrungsangebot anzupassen (Yamanaka et al., 2003).

Über die Stimulation kortikaler Aktivierung und körperlicher Bewegung sowie des Sympathikus ist das Hypocretinsystem in der Lage, den Energieverbrauch zu steigern. So lässt sich erklären, warum eine Hypocretingabe zwar zu einer Steigerung der Nahrungsaufnahme, nicht aber zu einer Steigerung des Körpergewichts führt, und Mäuse nach Ablation der Hypocretinneurone trotz Hypophagie unter Adipositas leiden (Yamanaka et al., 1999, Hara et al., 2001).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass das Hypocretinsystem Einfluss auf die Regulation des sympathischen Nervensystems hat. Ratten reagieren auf zentrale Hypocretingabe mit erhöhtem Blutdruck und gesteigerter Pulsfrequenz. Diese Effekte können durch die Gabe von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Adrenorezeptorblockern aufgehoben werden (Shirasaka et al., 1999). Auch die Feststellung, dass Mäuse ohne hypocretinerge Neurone einen 10-15 mmHg niedrigeren Blutdruck haben, legt dies nahe (Kayaba et al., 2003, Zhang et al., 2006).

Es gibt viele weitere Hormone und Neuropeptide, die Einfluss auf die Regulation der Energiehomöostase haben. Eine detaillierte Darstellung aller Mechanismen ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Hier soll nur auf die Rolle des Hypocretinsystems und auf die wichtigsten metabolischen Parameter eingegangen werden. Für weitere Informationen muss auf den Übersichtsartikel von Morton et al. (2006) verwiesen werden.

Hypocretin fungiert möglicherweise auch als ein primärer Sensor metabolischer Vorgänge, der Veränderungen registriert und sie beeinflusst. Mehrere Studien weisen auf eine direkte Aktivierbarkeit des Hypocretinsystems durch niedrige Leptin- und Glukosespiegel und hohe Ghrelinspiegel hin, wie sie nach Nahrungskarenz zu beobachten sind (Burdakov, 2005 und 2006, Sakurai, 2007). So ergab die Blutuntersuchung von fastenden Probanden

erhöhte Hypocretin-1- und erniedrigte Leptinspiegel, die in negativer Korrelation zueinanderstanden (Komaki et al., 2001).

Welchen Einfluss hat die Gabe von Hypocretin auf metabolische Parameter? In einer Studie an menschlichen Probanden wurden nach i.v. Injektion von Hypocretin-1 erniedrigte Leptin- und erhöhte Insulinwerte gemessen. Die Ghrelin- und Glukosekonzentrationen sowie die Appetit-Ratings blieben in dieser Studie unverändert (Ehrström et al., 2005). Diese Ergebnisse konnten durch Studien an Ratten z. T. nicht bestätigt werden. So reagierten nahrungsdeprivierte Ratten auf subkutane Gabe von Hypocretin mit erhöhten Leptinwerten, und die Infusion von Hypocretin-1 führte zu einer Erniedrigung ihrer Insulinspiegel (Switonska et al., 2002, Ouedraogo et al., 2003). In mehreren Studien an fastenden Ratten zeigte sich auch eine erhöhte Glukosekonzentration nach subkutaner oder intravenöser Hypocretin-1-Gabe (Nowak et al., 2000, Ouedraogo et al., 2003). Eventuell stehen diese im Zusammenhang mit der Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse), die ebenfalls in mehreren Studien nachgewiesen werden konnte (Kuru et al., 2000, Russell et al., 2001, Mazzocchi et al., 2001).

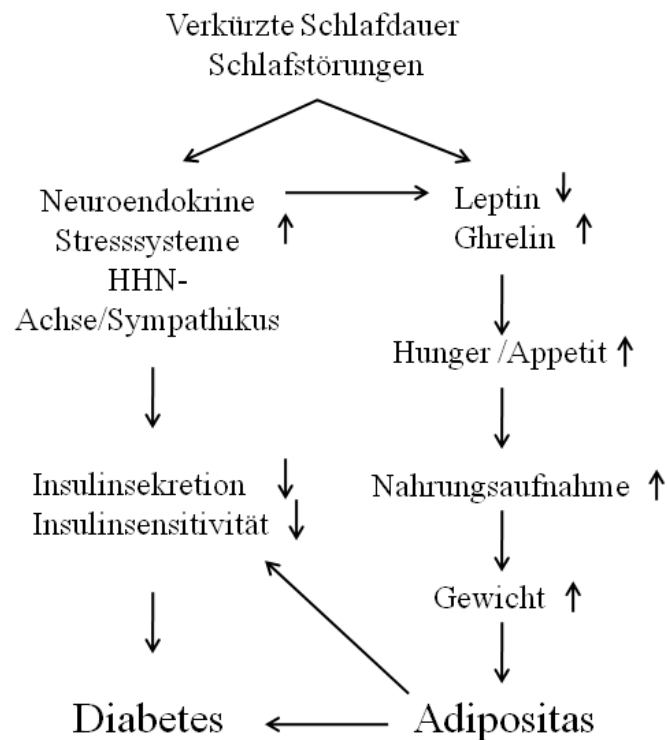
Insgesamt ist das Bild bezüglich des Einflusses von Hypocretin-1-Gabe auf metabolische Parameter noch recht uneinheitlich. Ebenso bleibt unklar, ob diese Effekte peripher oder zentral vermittelt sind, da auch im Plexus submucosus und myentericus des Verdauungstrakts und in den Inselzellen des Pankreas Hypocretinrezeptoren gefunden wurden (Nakabayashi et al., 2003). Umstritten ist auch, ob Hypocretin-1 überhaupt in der Lage ist, die Bluthirnschranke zu überwinden (siehe Kapitel 1.4.).

### 1.3. Schlaf und Metabolismus: Hypocretin als möglicher Mediator des Zusammenhangs

Die Prävalenz der Adipositas hat in den letzten Jahren weltweit deutlich zugenommen (Ogden et al., 2006, Berghöfer et al., 2008). Parallel zu dieser Entwicklung ist eine Abnahme der Dauer des Nachtschlafes und eine Zunahme an Schlafstörungen zu verzeichnen (National Sleep Foundation, 2009). Immer mehr Daten sprechen für einen möglichen kausalen Zusammenhang dieser beiden Entwicklungen. Das Hypocretinsystem ist ein potenzieller Mediator dieser Zusammenhänge, da es sensibel auf metabolische Hormone wie Leptin und Ghrelin reagiert und Einfluss auf die Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus hat. Epidemiologische Studien zeigen eine Assoziation von kurzer Schlafdauer und erhöhtem Body-Mass-Index (BMI) (Taheri et al., 2004). Besonders gut ist dieser Zusammenhang bei Kindern belegt (Sekine et al., 2002).

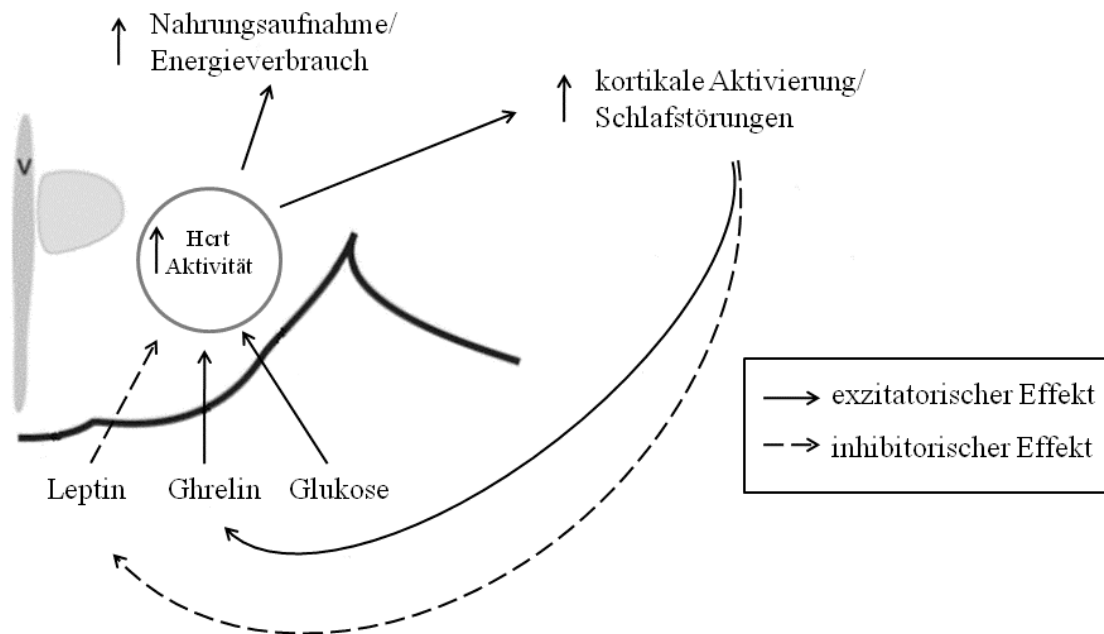
In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Schlafmangel zu vermehrter Nahrungsaufnahme, erniedrigten Leptinspiegeln und erhöhten Ghrelinspiegeln führt (Spiegel et al., 2004a). Auch eine Assoziation von kurzer Schlafdauer und Diabetes wird epidemiologisch beschrieben (Ayas et al., 2003). Hinweise auf Kausalzusammenhänge zwischen Schlafstörungen bzw. Schlafmangel und Diabetes liefern wiederum Spiegel et al. (2004b). Nach 6-tägiger Schlafrestriktion auf vier Stunden konnten bei den Probanden eine Verschlechterung der Glukosetoleranz und eine verminderte Insulinsekretion nachgewiesen werden. Diese Veränderungen sind möglicherweise auf eine Erhöhung des Sympathikotonus und eine mangelnde Suppression der HHN-Achse zurückzuführen, die ebenfalls in diesem Experiment beobachtet werden konnten und bekanntermaßen den Glukosestoffwechsel negativ beeinflussen. So fanden sich nach Schlafrestriktion signifikant höhere Cortisolspiegel am folgenden Nachmittag und Abend (Spiegel et al., 2004b).

Störungen des Nachtschlafes führen auch zu einer Reihe weiterer endokrinologischer Veränderungen. So wird durch mangelnden SWS die Ausschüttung des Wachstumshormons unterdrückt. Auch hohe Glukosespiegel sind in der Lage, die Wachstumshormonausschüttung zu supprimieren. Das Wachstumshormon ist also wie Hypocretin sensibel für Veränderungen des Schlafs und metabolischer Parameter. Seine Wirkung zielt in erster Linie auf das Wachstum von Skelett und Organen sowie die Schaffung der dafür erforderlichen metabolischen Voraussetzungen ab.



**Abb. 3:** Darstellung potenzieller Wechselwirkungen zwischen Schlaf, Adipositas und Diabetes. Nach Schmid und Schultes 2006.

Das Hypocretinsystem wird durch niedrige Leptin- und hohe Ghrelinspiegel, wie sie nach Schlafmangel zu beobachten sind, aktiviert (Yamanaka et al., 2003, Sakurai, 2007). Auch Schlafmangel selbst ist in der Lage, das Hypocretinsystem zu aktivieren (Wu et al., 2002, Pedrazzoli et al., 2004). Die hypocretinergen Neurone des Hypothalamus, die auf diese Weise aktiviert werden, nehmen wiederum Einfluss auf Schlaf und metabolische Prozesse. Hohe Hypocretinspiegel fördern die Nahrungsaufnahme, erhöhen den Energieverbrauch und verstärken über eine Steigerung der kortikalen Aktivierung die Wachheit. Diese erniedrigt die Leptin- und erhöht die Ghrelinwerte, was wiederum zu einer Aktivierung des Hypocretinsystems führt. Hier existiert möglicherweise ein positiver Feedback-Mechanismus, der den Schlaf-Wach-Rhythmus stabilisiert und der erst durch verstärkten Schlafdruck unterbrochen wird (Abb. 4).



**Abb. 4:** Die Rolle des Hypocretinsystems in der Detektion und Regulation von Schlaf und Metabolismus. Schematische Darstellung eines Koronarschnitts durch den Hypothalamus, (V=dritter Ventrikel), Nach Adamantis und de Lecea 2009.

Adipositas und das metabolische Syndrom sind gekennzeichnet durch hohe Leptinspiegel und Leptinresistenz. Oft werden diese Erkrankungen auch durch Inaktivität und Schlafstörungen begleitet (Fabricatore und Wadden, 2006). Hohe Leptinspiegel sind in der Lage, das Hypocretinsystem zu hemmen (Yamanaka et al., 2003). Möglicherweise führt bei diesen Erkrankungen eine niedrige Hypocretinaktivität über Schlafstörungen und vermehrte Müdigkeit zu einem verringerten Grundumsatz und damit zu einer weiteren Verstärkung der Symptome. Adam et al. konnte nachweisen, dass Menschen mit Adipositas erniedrigte Hypocretin-1-Spiegel aufweisen (Adam et al., 2002). Es gibt immer mehr Hinweise, dass eine Gabe von Hypocretinagonisten am Tage multiple positive Effekte bei der Behandlung des metabolischen Syndroms und der Adipositas haben könnte. Neben einer Steigerung des Energieverbrauchs, der Wachheit und einer Konsolidierung des Schlaf-Wach-Rhythmus gibt es Erkenntnisse, dass die Hypocretingabe auch zu einer Verbesserung der Leptinsensitivität führen könnte (Funato et al., 2009).

#### 1.4. Intranasale Gabe von Neuropeptiden

Mit der intranasalen Applikation von Neuropeptiden ist eine Applikationsform gefunden worden, die gegenüber der intravenösen oder der intrathekalen Applikation einige Vorteile bietet. Im Gegensatz zu der intravenösen oder intrathekalen Applikation ist die intranasale Applikation noninvasiv. Es besteht kein Infektionsrisiko, und sie ist absolut schmerzlos. Viele der intranasal applizierten Substanzen, wie z. B. die Neuropeptide Insulin, Vasopressin oder das Melanozyten stimulierende Hormon (MSH), sind innerhalb von 30-40 Minuten in hohen Konzentrationen im Liquor nachweisbar, während in der Peripherie kaum eine Erhöhung feststellbar ist (Born et al., 2002, Hanson et al., 2004). So werden periphere Nebenwirkungen, die zentrale Effekte überlagern könnten, minimiert. Die Substanzen umgehen bei intranasaler Gabe die Bluthirnschranke, die bei intravenöser Applikation für viele größere Moleküle und Peptide ein unüberwindbares Hindernis darstellt.

Es gibt zwei vermutete Wege, über die die Substanzen das Hirn erreichen. Beide führen durch die Lamina cribrosa entlang des Bulbus olfactorius zu tieferen Hirnstrukturen. Thorne et al. vermuten einen intraaxonalen Transport nach Endozytose in den Neuronen. Bei Mäusen konnte seine Gruppe hohe Konzentrationen der 48 Stunden vorher applizierten Wheat Germ Agglutinin-Horseradish Peroxidase (WGA-HRP) im Bulbus olfactorius nachweisen (Thorne et al., 1995). Die meisten Substanzen erreichen jedoch innerhalb von weniger als einer Stunde das ZNS, was einen ausschließlich intraaxonalen Transport unwahrscheinlich macht. Möglicherweise erfolgt der Transport extraneural in den Perineuralräumen (Illum, 2000).

Mehrere Faktoren beeinflussen die Absorptionsrate und die Geschwindigkeit des Transports. Undissoziiert vorliegende Substanzen werden besser absorbiert als dissoziiert vorliegende, und lipophile Substanzen überwinden die membranösen Strukturen leichter als hydrophile (Sarkane et al., 1991 und 1994). Es konnte belegt werden, dass Moleküle bis zu einer Größe von 20000 Da. über die Riechschleimhaut aufgenommen werden können (Sarkane et al., 1995). Die Bluthirnschranke dagegen erlaubt nur eine passive Diffusion bis zu einer Molekülgröße von 500 Da. (Pardridge, 2005). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen berichteten Fujiki et al., dass Hypocretin-1, welches ein Molekulargewicht von 3562 Da. besitzt, in einem Experiment an narkoleptischen Hunden nur nach sehr hohen i.v. Dosen überhaupt das ZNS erreicht (Fujiki et al., 2003). Allerdings wurden auch gegensätz-

liche Ergebnisse publiziert. Kastin und Ackerstrom berichteten, dass Hypocretin-1 die Bluthirnschranke durch einfache Diffusion überwindet (Kastin und Ackerstrom, 1999).

Mehrere Studien belegen die Effektivität der intranasalen Hypocretin-1-Gabe. An Maus und Ratte konnte gezeigt werden, dass nach intranasaler Gabe von Hypocretin-1 die Konzentration in vielen Hirnregionen um ein Vielfaches höher ist als nach der Applikation einer äquivalenten intravenösen Dosis. Dabei ist die Hypokretinkonzentration im Blut nach intranasaler Gabe um das Vielfache niedriger als nach intravenöser Applikation (Hanson et al., 2004, Dhuria et al., 2009). Auch in einer Studie an Rhesus-Affen zeigte die intranasale Applikation von Hypocretin-1 wesentlich stärkere Effekte als die intravenöse Gabe vergleichbarer Dosen (Deadwyler et al., 2007).

### 1.5. Fragestellung

In dieser Arbeit wurden die Wirkungen von intranasaler Hypocretin-1-Gabe auf Schlafarchitektur, Nahrungsaufnahme und metabolische Parameter untersucht. Neben der Polysomnografie, regelmäßigen Blutentnahmen und der morgendlichen Bestimmung der Katecholamine im Sammelurin sowie einem Testfrühstück kamen dabei psychologische Testverfahren zur Bestimmung von Hunger, Durst und Müdigkeit sowie der Stimmung zum Einsatz. Ziel war die Beantwortung folgender drei Fragen:

*Welchen Einfluss hat die intranasale Hypocretin-1-Gabe auf Schlaf-Wach-Rhythmus und Aktivierung?*

In Studien an Ratten führte die Hypocretin-1-Applikation zu gesteigerter Wachheit und einer Unterdrückung von REM- und NREM-Schlaf (Hagan et al., 1999). Die Gabe von Hypocretinantagonisten verstärkte die Müdigkeit und vermehrte den REM- und NREM-Schlaf auch beim Menschen (Brisbare-Roch et al., 2007). Es ist also zu erwarten, dass die Hypocretingabe zu einer Verlängerung der Einschlaf latenz sowie zu einer Verminderung des Nachtschlafs führt. Ebenso müssten sich die von den Probanden geäußerten Selbsteinschätzungen dementsprechend verändern.

*Welchen Einfluss hat die intranasale Hypocretin-1-Gabe auf metabolische Parameter wie Insulin, Leptin, Blutzucker, ACTH, Cortisol und Wachstumshormon sowie die Katecholaminausscheidung im Sammelurin?*

Bezüglich der Insulin-, Leptin- und Blutzuckerspiegel nach Hypocretingabe ist es schwer, eine Prognose zu treffen. Hier sind nach Hypocretin-1-Gabe unterschiedliche und teilweise einander widersprechende Effekte beobachtet worden (Nowak et al., 2000, Switonska et al., 2002, Ouedraogo et al., 2003, Ehrström et al., 2005). Zentrale Applikation von Hypocretin-1 führt bei Ratten zu einer Aktivierung der HHN-Achse (Kuru et al., 2000, Russell et al., 2001). Es ist also zu erwarten, dass auch die intranasale Hypocretin-1-Gabe beim Menschen zu einer vermehrten Kortisol- und ACTH-Ausschüttung (adrenocorticotropes Hormon) führt.

Zwischen Hypocretin-1-Gabe und Wachstumshormon sind bisher keine direkten Interaktionen beschrieben worden. Dennoch ist zu erwarten, dass über eine Störung des Nachtschlafs die Wachstumshormon-Sekretion vermindert wird. Im Tierexperiment aktiviert die



zentrale Hypocretin-1-Gabe das sympathische Nervensystem (Shirasaka et al., 1999). Es ist daher damit zu rechnen, dass auch die Hypocretin-1-Gabe beim Menschen zu einer Aktivierung des Sympathikus und damit zu einer Steigerung der Katecholaminausschüttung im Sammelurin führt.

*Welchen Einfluss hat die intranasale Hypocretin-1-Gabe auf Hunger, Durst und Nahrungsaufnahme?*

Verabreicht man Ratten zentral Hypocretin-1, reagieren sie mit gesteigerter Nahrungsaufnahme (Sakurai et al., 1998, Yamanaka et al., 1999, Edwards et al., 1999). Bei Rhesus-Affen wurden allerdings auch gegensätzliche Effekte beschrieben (Remsey et al., 2005). Die periphere Gabe von Hypocretin-1 beim Menschen konnte – möglicherweise wegen der Unfähigkeit von Hypocretin-1, die Bluthirnschranke zu überwinden – keine Steigerung der Nahrungsaufnahme auslösen (Ehrström et al., 2005). Dennoch ist nach intranasaler Gabe ein die Nahrungsaufnahme steigernder Effekt anzunehmen, da so die Bluthirnschranke umgangen werden kann, und Studien gezeigt haben, dass das Hypocretinsystem phylogenetisch hoch konserviert ist zwischen den Spezies (Sakurai et al., 1998). Es ist also zu erwarten, dass die Hypocretingabe zu einer Steigerung der morgendlichen Kalorienaufnahme führt, und auch die von den Probanden geäußerten Selbsteinschätzungen dementsprechend verändert sind.

## 2. Probanden und Methoden

### 2.1. Versuchspersonen

Untersucht wurden 12 Frauen und 14 Männer zwischen 23 und 60 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug  $36,5 \pm 2,2$  Jahre. Der Body Mass Index (BMI) der Probanden betrug  $27,7 \pm 0,7$  kg/m<sup>2</sup>. Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie waren regelmäßiger Schlafrhythmus sowie Verzicht auf Schichtarbeit in den letzten sechs Wochen vor dem Versuch. Ausschlusskriterien waren regelmäßige Medikamenteneinnahme, akute und chronische Erkrankungen und Schlafstörungen wie starkes Schnarchen und häufiges nächtliches Wasserlassen. Auch sieben Raucher nahmen an der Studie teil. Die Einschlusskriterien zu dieser Studie wurden so breit gewählt, da die Probanden als Kontrollgruppe für eine andere Studie dienten.

In einer Voruntersuchung wurden alle kardiopulmonalen, neurologischen oder anderen Erkrankungen ausgeschlossen. Neben einer ausführlichen Anamneseerhebung wurde der Blutdruck gemessen und eine Blutuntersuchung durchgeführt. Dabei wurden unter anderem folgende Parameter bestimmt: Blutbild (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, Hämatokrit), Elektrolyte (Natrium, Kalium, Calcium im Plasma), Testosteron, LDL, HDL,  $\gamma$ -GT, Creatinin und TSH im Serum.

Die Versuchspersonen wurden angewiesen, am Tag vor dem Versuch ausreichend zu schlafen und zu einer normalen Zeit aufzustehen, tagsüber nicht mehr zu schlafen sowie am Versuchstag keinen Alkohol oder koffeinhaltige Getränke zu sich zu nehmen. Die letzte Mahlzeit sollte bis 14 Uhr erfolgen. Alle Versuchsteilnehmer wurden ausführlich aufgeklärt und unterschrieben eine Einverständniserklärung.

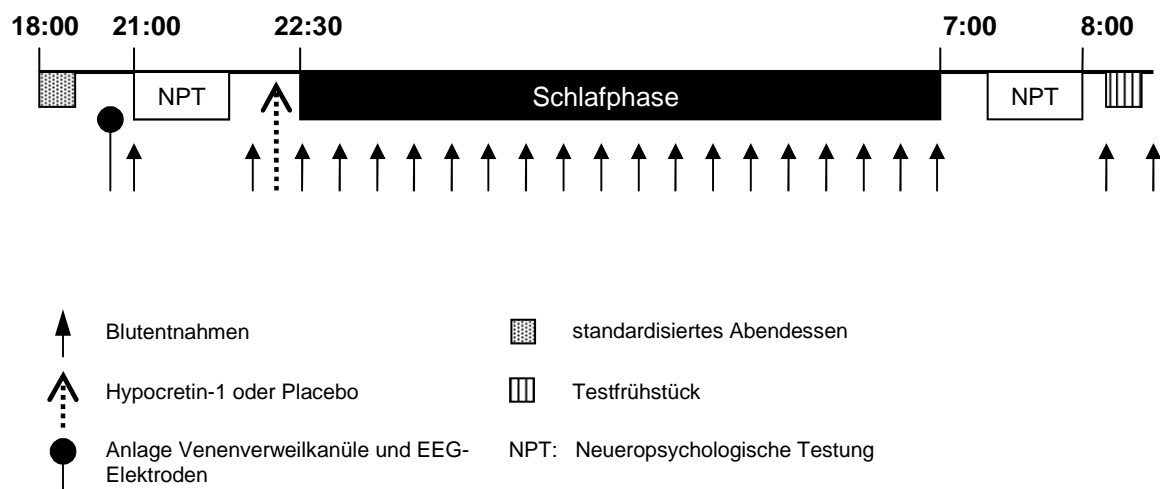
Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt.

### 2.2. Versuchsablauf

Die Experimente erfolgten bei den männlichen Versuchspersonen im Abstand von mindestens einer Woche, bei den weiblichen im Abstand von vier Wochen ( $\pm 2$  Tage), um zyklusabhängige Schwankungen zu minimieren. Vor den Experimentalnächten fand eine Eingele-

wöhnungsnacht statt, um die Probanden an das Schlafen mit Venenzugang und Elektroden zur polysomnografischen Schlafableitung zu gewöhnen.

Die Versuchsnächte begannen jeweils um 18:00 Uhr mit einem Abendessen. Danach erfolgte die Anlage der EEG-Elektroden und des Venenkatheters für die Blutentnahmen. Nach der Testbatterie wurde Hypocretin-1 bzw. Placebo als Nasenspray verabreicht. Um 22:30 Uhr begann die Schlafphase. Um 7:00 Uhr wurden die Probanden geweckt. Nach einer zweiten Testbatterie endete das Experiment mit einem großen Frühstück.



**Abb. 5:** Versuchsablauf im Überblick

Das Abendessen war standardisiert und bestand aus Vollkornbrot, Wurst, Margarine und Streichkäse. Es enthielt ca. 600 kcal. Die Probanden wurden angewiesen, das präsentierte Abendessen vollständig aufzuessen. Auf das Anlegen der Elektroden für die polysomnografische Schlafaufzeichnung folgte die erste Blutentnahme mit zusätzlicher Bestimmung von Elektrolyten, Osmolalität und kleinem Blutbild. Nach jeder Blutentnahme wurden Blutdruck und Pulsfrequenz gemessen.

Gegen 21:00 Uhr begann die Testbatterie, bestehend aus Eigenschaftswörterliste (EWL-K Janke und Debus 1978), Stanford Schläfrigkeitsskala, einem modifiziertem Stroop-Test (mit Essenswörtern), Zahlennachsprechen (Hamburg-Wechsler-Intelligenz-Test) und einem Fragebogen zur Selbstbeschreibung (STAI-G). Zusätzlich wurden die Lernphasen des Paar-assoziiertes-Wortlernens (PAL) (deklaratives Lernen) und des Fingertappings (proze-

durales Lernen) absolviert. Diese Arbeit präsentiert die Daten der Polysomnografie, die Ergebnisse der Blutentnahmen sowie die relevanten Ergebnisse der behavioralen Tests. Die Ergebnisse des Paar-assoziertes-Wortlernens (PAL) und des Fingertappings sind in der Dissertation von Nicole Grimske zu finden.

Nach der Testbatterie wurden die Probanden gebeten, ihre Blase zu entleeren (ab jetzt Beginn der Urinsammlung) und sich ins Bett zu legen. An den Venenkatheter wurden zwei hintereinander geschaltete Perfusorleitungen angeschlossen, die eine Blutentnahme vom Nebenraum aus (im „through-the-wall“-Verfahren) ermöglichten, ohne den Probanden zu stören. Nach der zweiten Blutentnahme erfolgte um 22:00 Uhr die doppelblinde, randomisierte Gabe von 500 nmol Hypocretin-1 (Bachem AG Schweiz) oder Placebo (2ml Natriumchlorid-Lösung) intranasal (ein Sprühstoß rechts und links jede Minute über 10 Minuten).

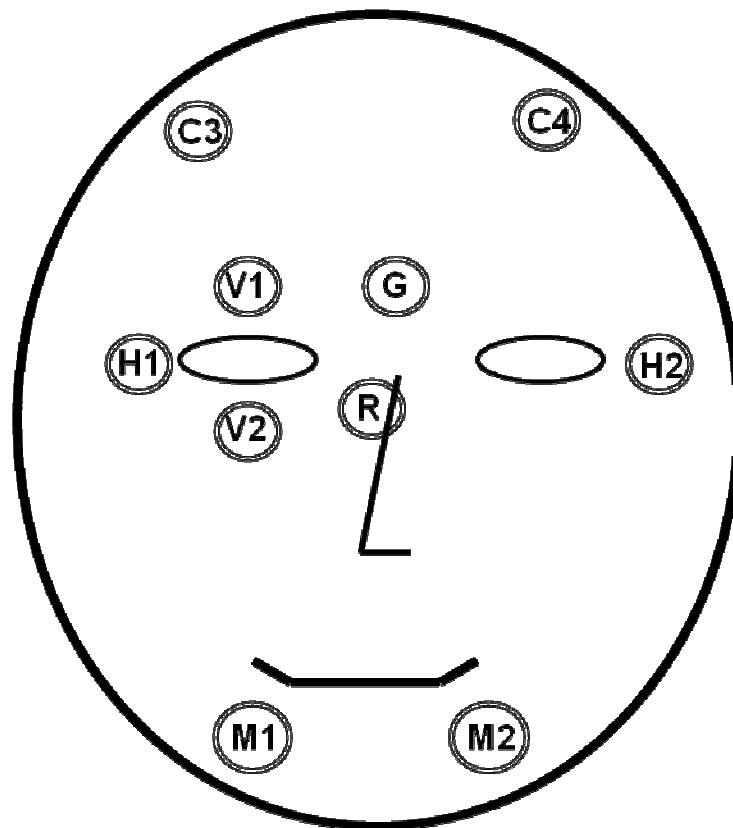
Um 22:30 Uhr wurde das Licht gelöscht und mit der polysomnografischen Aufzeichnung begonnen. Über die Nacht wurde in einem Abstand von 30 Minuten Blut abgenommen. Um 7:00 Uhr wurden die Probanden geweckt und gebeten, ihre Blase zu entleeren. Der Morgenurin diente zur Bestimmung der über die Nacht ausgeschiedenen Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin. Anschließend wurden die Probanden mithilfe eines Fragebogens über ihre Schlafqualität befragt. Nach mindestens 30 Minuten erfolgte die Testbatterie mit der Abfrage des am vorigen Tag Gelernten. Es folgte eine Blutentnahme (wiederum mit Bestimmung von kleinem Blutbild, Elektrolyten und Osmolalität) über den Venenkatheter. Zusätzlich wurde mit einem Butterfly eine CREB-Monovette zur Bestimmung des IL-6 Systems abgenommen. Der Versuch endete mit einem reichhaltigen Testfrühstück, mit dem die morgendlich aufgenommene Kalorienmenge bestimmt wurde, und einer letzten Blutentnahme.

Zusätzlich zu der Testbatterie wurde nach dem Abendessen, vor und nach der Substanzgabe, nach dem Wecken und jeweils nach der morgendlichen Testbatterie und dem Frühstück eine Befindlichkeitstestung durchgeführt. Die Probanden wurden gebeten, auf einer Zehnpunkte-Skala Durst, Hunger, und Müdigkeit anzugeben. Des Weiteren wurden sie angewiesen, eine Bipolar-Skala, bestehend aus 20 gegensätzlichen Adjektivpaaren, auszufüllen, um so ihre Befindlichkeit zu dokumentieren.

## 2.3. Erhobene Daten

### 2.3.1. EEG-Aufzeichnung

Die EEG-Aufzeichnung erfolgte mit einem PC. Verwendet wurde das Programm „Brain Vision Recorder“ (Brain Products<sup>®</sup>, Gilching) und der dazugehörigen Verstärker Brain Amps mit einer Abtastfrequenz von 200 Hz. Folgende Kanäle wurden abgeleitet: Zwei Kanäle für das Elektroenzephalogramm (EEG), zwei Kanäle für das Elektrokulogramm (EOG) und ein Kanal für das Elektromyogramm. Es wurden hierfür insgesamt 10 Silber-/Silberchlorid-Elektroden (Ag/AgCL) platziert, deren Lage aus der folgenden Abbildung hervorgeht. Für die Ableitung des EEG wurden zwei Elektroden (C3 + C4) über dem zentralen Kortex angebracht und gegen die Referenzelektrode (R) (seitlich des Nasensattels) abgeleitet. Oberhalb und unterhalb eines Auges (V1+V2) sowie an den seitlichen Orbitarändern (H1+H2) wurden Elektroden zur Aufzeichnung der horizontalen und vertikalen Augenbewegungen angebracht. Zwei Elektroden unterhalb der Mundwinkel (M1+M2) leiteten bipolar das EMG ab. Die Erdungselektrode (G) wurde auf der Mitte der Stirn platziert.



**Abb. 6:** Positionierung der Elektroden zur polysomnografischen Schlafaufzeichnung.

Vor dem Aufbringen der Elektroden wurde die Haut mit Cutasept<sup>®</sup> F (Bode Chemie, Hamburg) entfettet und mit Aufraupaste (Everi conductive and abrasive paste, Spes Medica Italy) behandelt. Dieser Vorgang wurde gegebenenfalls wiederholt, wenn die gemessene Impedanz über 5 k $\Omega$  lag. Die EEG-Elektroden C3 und C4 wurden direkt mit Elektrodenpaste (EC2<sup>®</sup> Elektrode Cream, Grass Product Group, England) aufgeklebt. Die restlichen Elektroden im Gesichtsbereich wurden zusätzlich mit Kleberingen versehen. Alle Elektroden wurden mit Pflasterstreifen fixiert.

### 2.3.2. Blutentnahmen

Über die Nacht über wurde den Probanden insgesamt 22 Mal Blut abgenommen. Vor und nach der Schlafphase erfolgten die Abnahmen direkt aus dem Venenkatheter (Vasofix<sup>®</sup>, G 18, B. Braun, Melsungen), während der Schlafphase halbstündlich über Perfusorleitungen (Combidyn<sup>®</sup> Druckschlauch, B. Braun, Melsungen) und einen Dreiwegehahn (Discofix<sup>®</sup>, Braun, Melsungen) im Trough-the-Wall-Verfahren. Zum Offenhalten des Venenkatheters für die Dauer des Experiments wurde Natriumchlorid-Lösung 0,9 % (B. Braun, Melsungen) infundiert (nicht mehr als 500 ml in einer Versuchsnacht). Während der Schlafphase wurden vor jeder Blutentnahme 3 ml NaCl-Lösung (Innenvolumen der Perfusorleitungen) und 2 ml Blut mit einer Spritze (Discardit<sup>™</sup> II, BD, Fraga, Spanien) aspiriert und verworfen. Abgenommen wurden jeweils für die Bestimmung von Insulin, Cortisol, Leptin und Wachstumshormon 2,7 ml Blut in einer Serummonovette (S-Monovette, 9 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Inhalt: Granulat und Gerinnungsaktivator), für die ACTH-Bestimmung 1,6 ml in einer EDTA-Monovette (S-Monovette, 2,7 ml KE, Sarstedt, Nümbrecht) und für die Bestimmung von Hypocretin 2 ml in einer Spritze. Am Ende wurde mit einer weiteren Spritze das Schlauchsystem mit 5 ml NaCl-Lösung gespült.

Ein Tropfen des Blutes aus der Spritze wurde zur Bestimmung der Blutglukose mit dem HemoCue Glucose 201 (HemoCue<sup>®</sup>, Angelholm, Schweden) verwendet. Der Rest wurde in einen Glasvacutainer (BD Vacutainer Systems, Plymouth, England, Inhalt 0,054 ml K3E 15 %) eingebracht und mit 0,1 ml Trasylol 1,0 (Proteinase-Inhibitor, Bayer, Leverkusen) versetzt. Die EDTA-Monovette und der Vacutainer wurden sofort mit Eis gekühlt. Nach jeder dritten Blutabnahme wurden die Proben bei 4000 U/min und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert.

Anschließend wurde das Plasma in Reagiergefäße (Reagiergefäß 1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert und bei -15 °C eingefroren. Abends und morgens erfolgte zur Kontrolle die Bestimmung von Natrium und Osmolalität. Auch ein kleines Blutbild wurde jeweils erstellt.

Die Blutglukosekonzentrationen wurden mit Hilfe der Glukose-Dehydrogenase-Methode gemessen (HemoCue B-Glucose-Analyzer, Ängelholm, Schweden). Die intra- und inter-Assay Variationskoeffizienten (VK) betragen hierbei: < 3,5 % bzw. < 2,7 %.

Die Serumkonzentrationen von Insulin, Cortisol Wachstumshormon und ACTH wurden durch kommerziell erhältliche Immunoassays (Immulite, Siemens, Eschborn, Deutschland) bestimmt. Die intra- bzw. inter-Assay Variationskoeffizienten (VK) und analytischen Sensitivitäten (aS) betragen hierbei: Insulin: VK 5,2 – 6,4%, bzw. 5,9 – 8,0%, aS 2uIU/ml; Cortisol: 6,7 – 8,8%, bzw. 6,3 – 10%, aS 0,2ug/dl; Wachstumshormon: VK 5,3 – 6,5%, bzw. 5,7 – 6,1%, aS 0,01ng/ml; ACTH: VK 3,1 – 9,6%, bzw. 5,1 – 9,4%, aS 9pg/ml.

Die Serumkonzentration von Leptin wurde mit Hilfe eines Radioimmunoassay (RIA) (Linc Research, St. Charles, USA) bestimmt. Hier betrug der intra-Assay VK 3,4 – 8,3% und der inter-Assay VK 3,0 – 6,2%, die analytische Sensitivität lag bei 0,5ng/ml.

2.3.3. Testfrühstück

Zur Ermittlung der morgendlichen Kalorienaufnahme wurde den Probanden ein großes Frühstück präsentiert. Dass es sich dabei um ein Testfrühstück handelte, war ihnen nicht bekannt. Zur Ermittlung der aufgenommenen Kalorienmenge und des Anteils an Kohlenhydraten, Fett und Protein wurden die einzelnen Produkte vor und nach dem Frühstück gewogen. Serviert wurde das Frühstück mit Kaffee oder Tee.

Tab. 1: Zusammenstellung des Testfrühstücks

Lebensmittel	Menge (g)	Kohlenhydrate (g)	Fett (g)	Protein (g)	Kalorien (kcal)
Kondensmilch	30	3,24	1,2	2,25	34,30
Zucker	24	23,95	0,0	0,00	101,31
Milch	750	36,00	26,2	24,75	499,26
Brötchen	300	153,00	4,2	7,81	719,00
Vollkornbrot	165	70,95	2,3	12,00	372,11
Weißbrot	30	14,55	0,4	2,23	74,67
Butter	100	0,60	83,2	0,67	773,31
Halbfettmargarine	20	0,08	8,0	0,32	75,53
Konfitüre	50	35,80	0,0	0,03	152,30
Haselnusscreme	40	29,70	0,3	3,20	142,12
Honig	40	30,00	0,0	0,14	127,49
Geflügelwurst	40	0,13	4,3	8,26	75,16
Cervelatwurst	34	0,07	10,2	6,12	120,34
Schnittkäse	100	0,00	29,2	25,50	377,38
Frischkäse	33	0,62	7,7	2,97	86,54
Fruchtquark	150	23,10	3,9	9,20	172,63
Kräuterfrischkäse	40	1,00	11,6	3,20	124,83
Orangensaft	400	36,00	1,0	4,00	178,43
Apfel	130	14,82	0,7	0,39	71,54
Banane	150	32,10	0,3	1,65	145,53
Vanillepudding	125	20,75	3,7	3,50	137,19
Erdbeermilch	200	18,20	6,8	7,40	171,05
<b>Gesamt</b>		<b>544,66</b>	<b>205,51</b>	<b>125,59</b>	<b>4732,02</b>



#### 2.4. Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mit einer Kovarianzanalyse (ANCOVA) mit den Faktoren *Bedingung* (Hypocretin-1 und Placebo), *Zeit* und *Geschlecht* ausgewertet. Als Kovariaten wurden *Alter*, *BMI*, und *Raucher/Nichtraucher* berücksichtigt. Teilweise ergaben sich Probleme bei der nächtlichen Blutentnahme, sodass Einzelwerte fehlen. Dies erklärt die variierenden Fallzahlen und die unterschiedliche Größe der Standardabweichung bei den einzelnen Parametern. Als Signifikanzniveau wurde  $p \leq 0,05$  festgelegt.

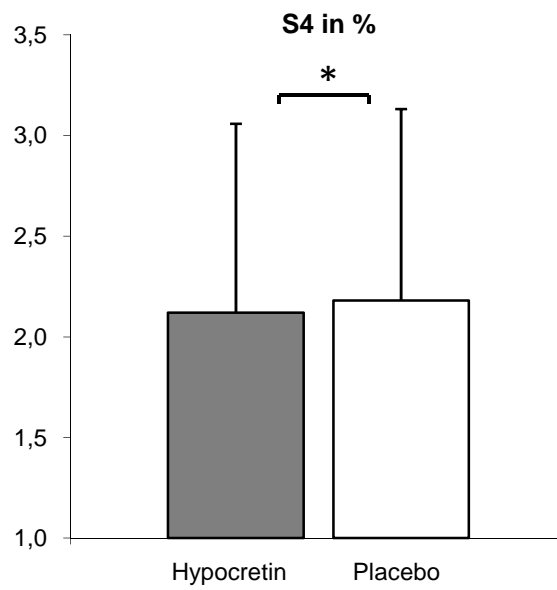
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Schlaf-EEG

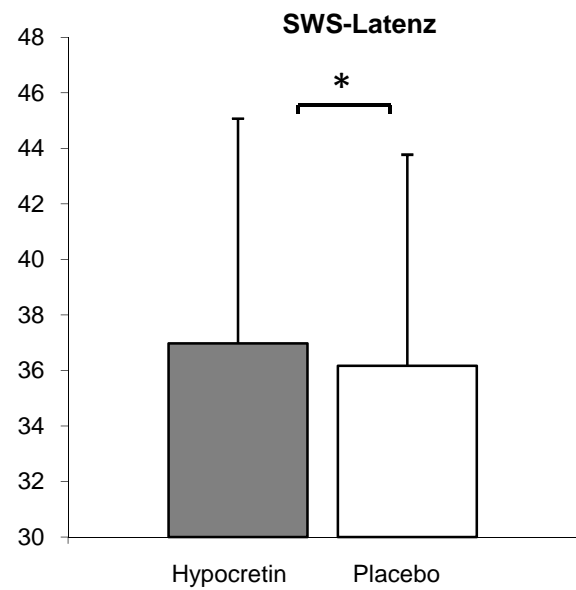
In der Tabelle 2 und in den Abbildungen 7 und 8 sind die Ergebnisse der Analyse der Schlaf-EEGs aufgeführt. Auffällig sind die signifikante Abnahme des Tiefschlafstadiums S4 und die signifikante Verlängerung der Latenz bis zum Eintreten der Schlafstadien 3 und 4 (Slow-Wave-Sleep-Latenz) unter der Hypocretinbedingung. Der Unterschied in der Gesamtschlafdauer zwischen der Hypocretin- und der Placebobedingung ist nicht signifikant.

**Tab. 2:** Dauer der Schlafstadien unter der Hypocretin- und der Placebobedingung in Minuten und Prozent (MW  $\pm$  SEM). \*  $p \leq 0,05$

	<b>Einheit</b>	<b>Hypocretin-1</b> MW $\pm$ SEM	<b>Placebo</b> MW $\pm$ SEM	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>Wach</b>	Prozent	4,47 $\pm$ 1,30	3,15 $\pm$ 1,05	0,08	0,779
<b>S1</b>	Prozent	7,78 $\pm$ 1,07	9,12 $\pm$ 1,26	0,00	0,987
<b>S2</b>	Prozent	61,66 $\pm$ 2,07	61,18 $\pm$ 1,87	0,30	0,591
<b>S3</b>	Prozent	7,27 $\pm$ 0,71	8,15 $\pm$ 0,98	1,31	0,269
<b>S4</b>	Prozent	2,04 $\pm$ 0,94	2,29 $\pm$ 0,95	5,29	<b>0,034*</b>
<b>SWS</b>	Prozent	9,31 $\pm$ 1,33	10,43 $\pm$ 1,55	0,03	0,868
<b>REM</b>	Prozent	16,57 $\pm$ 0,61	15,88 $\pm$ 0,97	0,45	0,541
<b>Bewegung</b>	Prozent	0,22 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,05	0,07	0,798
<b>Einschlaflatenz</b>	Minuten	31,62 $\pm$ 7,62	22,90 $\pm$ 3,96	0,18	0,675
<b>SWS-Latenz</b>	Minuten	36,98 $\pm$ 8,10	36,17 $\pm$ 7,61	5,18	<b>0,036*</b>
<b>REM-Latenz</b>	Minuten	133,43 $\pm$ 13,05	118,64 $\pm$ 9,76	2,98	0,102



**Abb. 7:** Darstellung des prozentualen S4-Anteils unter der Hypocretin- und der Placebo-bedingung (MW  $\pm$  SEM). \*  $p \leq 0,05$



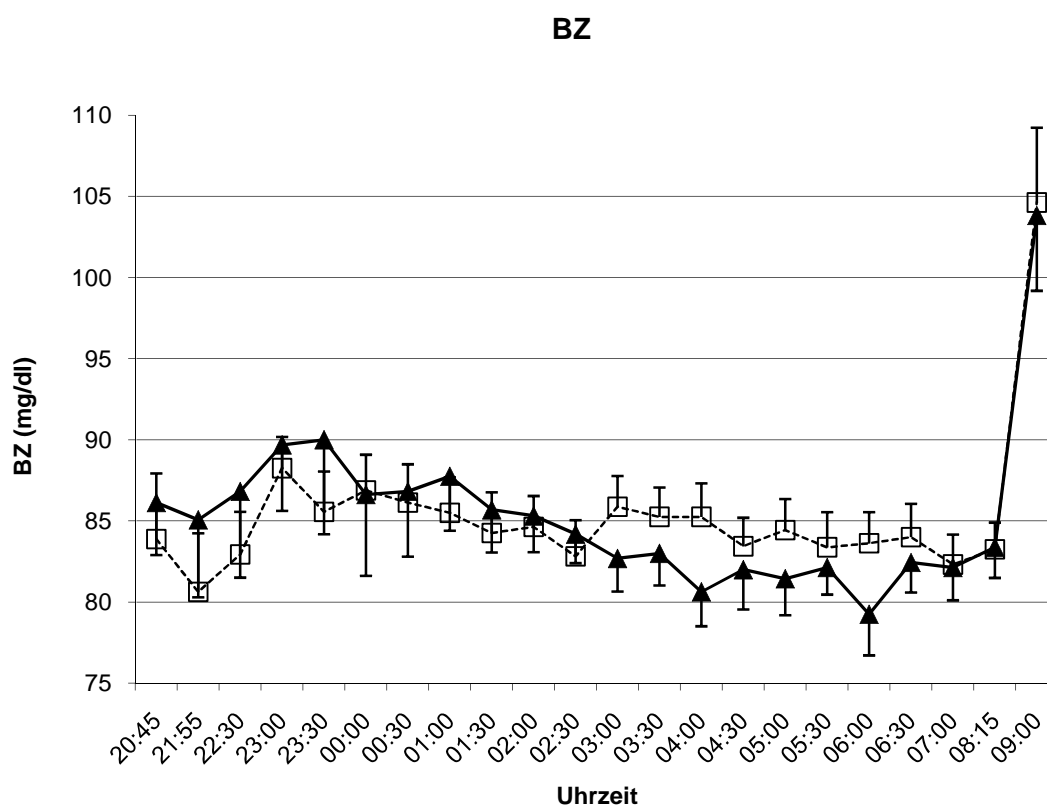
**Abb. 8:** Darstellung der SWS-Latenz in Minuten unter der Hypocretin- und der Placebobedingung (MW  $\pm$  SEM). \*  $p \leq 0,05$

### 3.2. Blutproben

Den Probanden wurde im Laufe des Versuches 22 Mal Blut abgenommen: zwei Mal abends vor der Substanzgabe, halbstündlich während der Schlafphase und morgens vor sowie nach dem Testfrühstück. Bestimmt wurden jeweils Blutzucker, Insulin, Leptin, Cortisol, ACTH und Wachstumshormon.

#### 3.2.1. Blutzucker

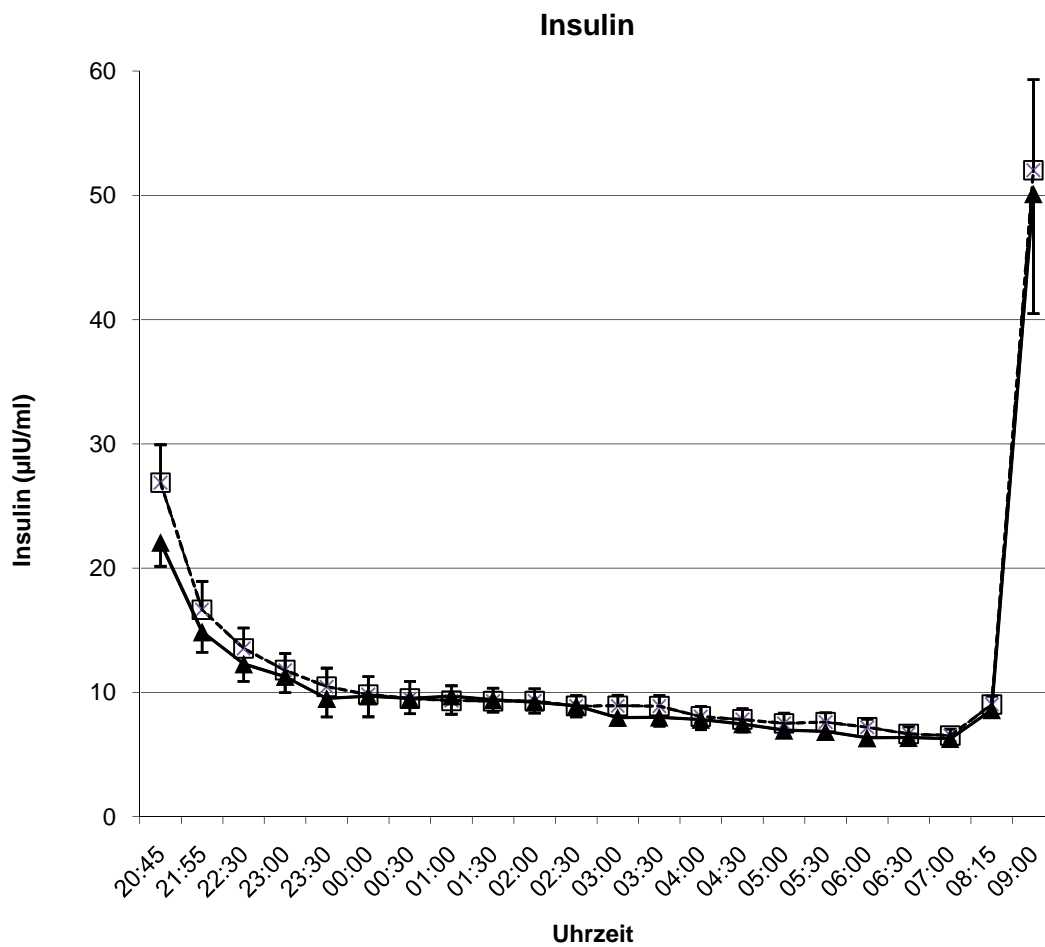
In Abbildung 9 ist der Verlauf der Blutzuckerwerte dargestellt. Nach einem leichten Anstieg zu Beginn der Schlafphase fällt der Blutzuckerspiegel kontinuierlich ab. Nach dem Frühstück steigt der Blutzuckerspiegel wie zu erwarten wieder an. Beim Vergleich der Konzentrationen nach Hypocretin- und Placebogabe fanden sich keine signifikanten Unterschiede ( $F=0,582$ ,  $p=0,661$ ). Die Analyse unter Berücksichtigung des Faktors *Geschlecht* ergab ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse ( $F=1.192$ ,  $p=0,328$ ).



**Abb. 9:** Verlauf der Blutzuckerwerte unter der Hypocretin- (Dreiecke) und der Placebobedingung (Vierecke) (MW±SEM)

3.2.2. *Insulin*

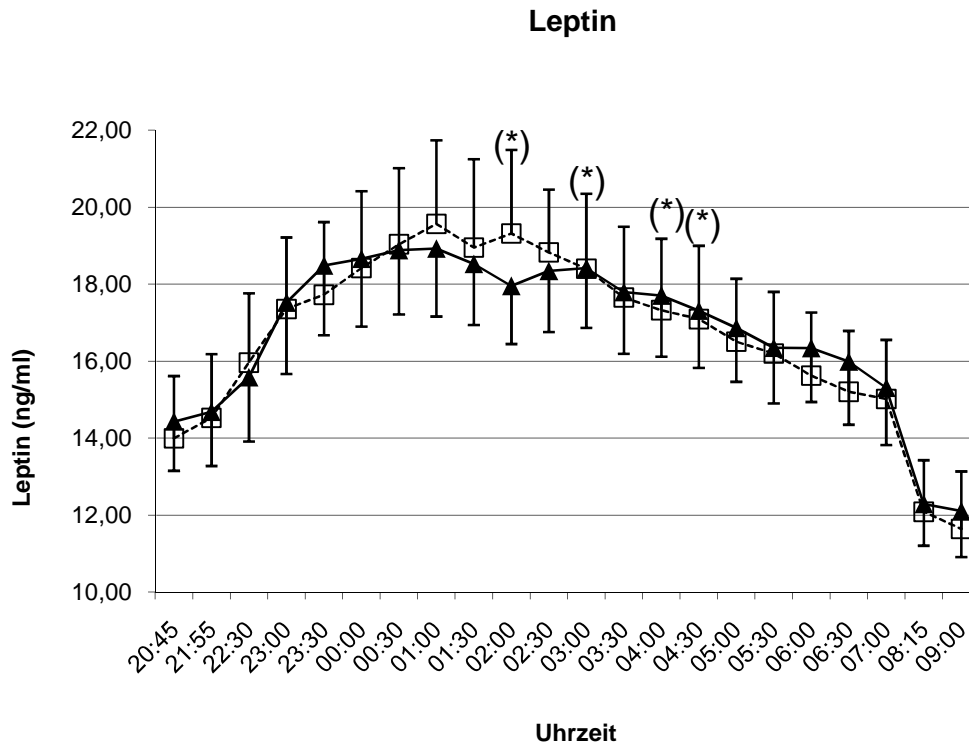
Der Verlauf des Insulinspiegels zeigt einen ähnlichen Verlauf wie der des Blutzuckers mit einem kontinuierlichem Abfall über die Nacht und einem sprunghaften Anstieg postprandial. Auch beim Vergleich der Konzentrationen nach Hypocretin- und Placebogabe fanden sich für die Insulinwerte keine signifikanten Unterschiede ( $F=0,168$ ,  $p=0,781$ ). Die Analyse unter Berücksichtigung des Faktors *Geschlecht* ergab ebenso keine signifikanten Ergebnisse ( $F=0,152$ ,  $p=0,796$ ).



**Abb. 10:** Verlauf des Insulinspiegels unter der Hypocretin- (Dreiecke) und der Placebobedingung (Vierecke) (MW±SEM)

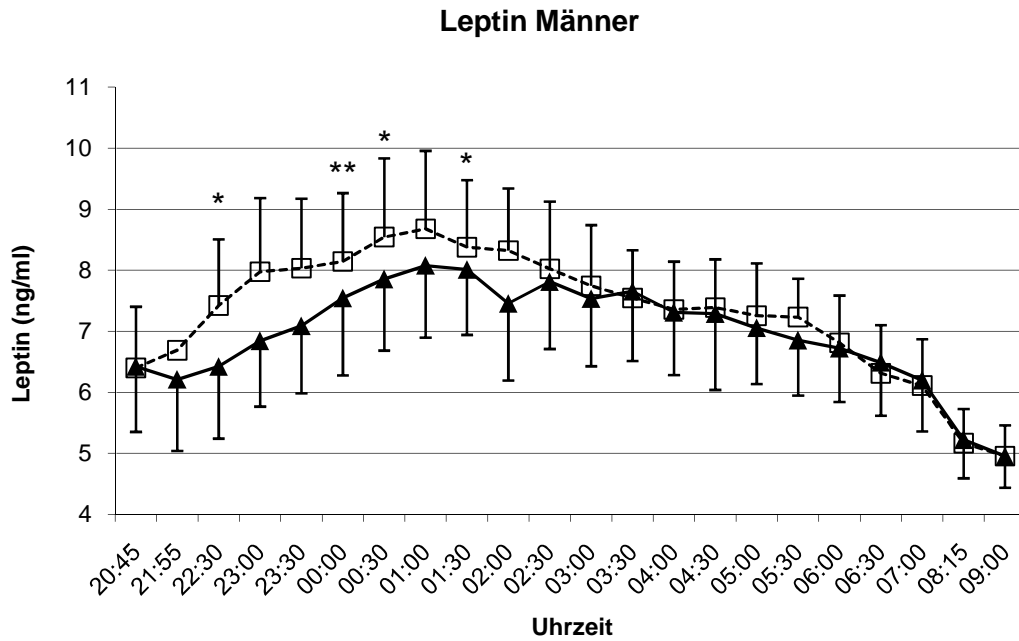
3.2.3. *Leptin*

Die Leptinkonzentration erreicht in der ersten Nachthälfte ihr Maximum, um dann bis zu den Morgenstunden kontinuierlich abzufallen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Hypocretin- und der Placebobedingung fanden sich nicht ( $F=1,289$ ,  $p=0,291$ ).



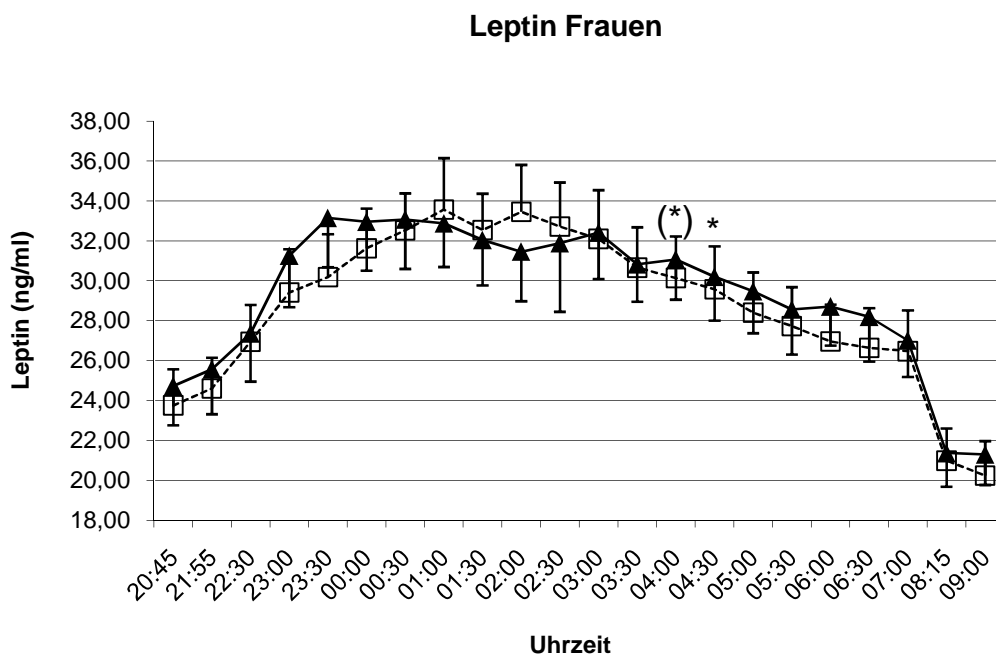
**Abb. 11:** Verlauf des Leptinspiegels unter der Hypocretin- (Dreiecke) und der Placebobedingung (Vierecke) ( $MW \pm SEM$ )

Die Analyse unter Berücksichtigung des Faktors *Geschlecht* war signifikant ( $F=3,403$ ,  $p=0,018$ ). Dabei weisen die männlichen Probanden in der ersten Nachthälfte unter der Hypocretinbedingung einen im Trend niedrigeren Leptinspiegel als unter der Placebobedingung auf ( $F=4,782$ ,  $p=0,080$ ). In den Einzelvergleichen sind die Leptinwerte nach Hypocretingabe um 22:30 Uhr ( $F=8,785$ ,  $p=0,031$ ), 0:30 Uhr ( $F=13,659$ ,  $p=0,014$ ) und 1:30 Uhr ( $F=6,720$ ,  $p=0,049$ ) signifikant und um 0:00 Uhr ( $F=20,670$ ,  $p=0,006$ ) hochsignifikant niedriger als nach Placebogabe.



**Abb. 12:** Verlauf des Leptinspiegels der Männer unter der Hypocretin- (Dreiecke) und der Placebobedingung (Vierecke) (MW±SEM), \* $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$

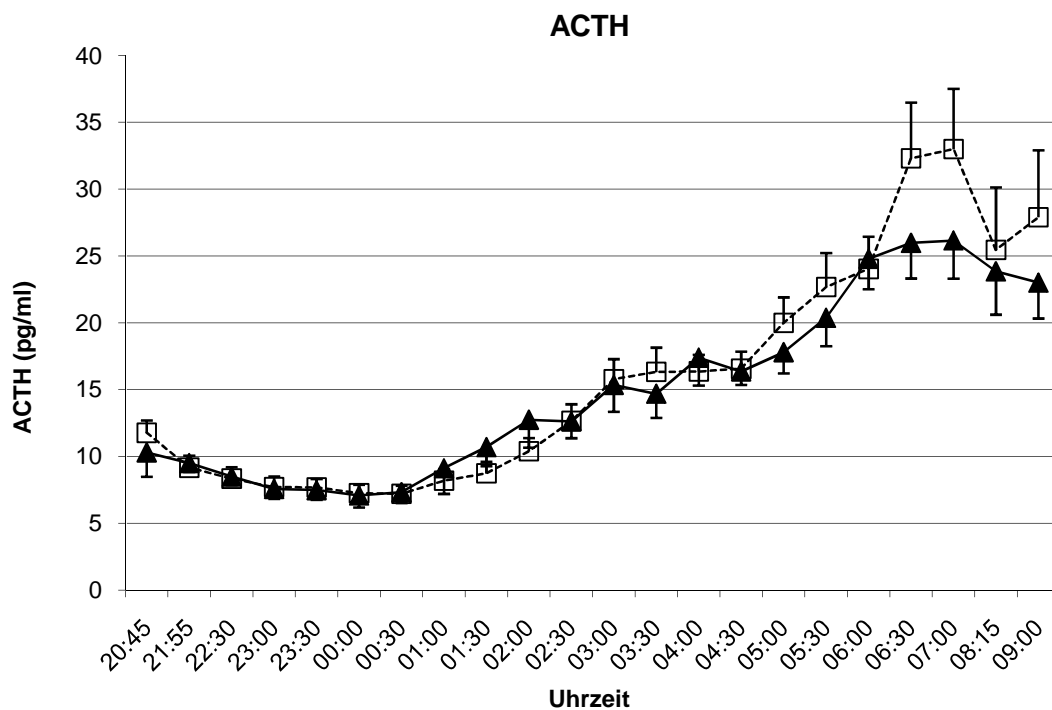
Für die Probandinnen zeigte sich ein anderes Ergebnis: statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich der Konzentrationen nach Hypocretin- und Placebogabe fanden sich hier nicht ( $F=2,291$ ,  $p=0,248$ ).



**Abb. 13:** Verlauf des Leptinspiegels der Frauen unter der Hypocretin- (Dreiecke) und der Placebobedingung (Vierecke) (MW±SEM)

## 3.2.4. ACTH

Der Verlauf der ACTH-Werte folgt dem physiologischen Nachtprofil. Beginnend mit einem leichten Abfall kommt es nach 0 Uhr zu einem Anstieg mit Gipfel um 7 Uhr, gefolgt von einem leichten Abfall. Statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich der Konzentrationen nach Hypocretin- und Placebogabe fanden sich nicht für den Gesamtverlauf ( $F=0,510$ ,  $p=0,681$ ). (Der scheinbare Unterschied zwischen den Bedingungen in den Morgenstunden fällt aufgrund der Einbeziehung der Kovariaten nicht signifikant aus.) Die Analyse unter Berücksichtigung des Faktors *Geschlecht* ergab keine signifikanten Unterschiede ( $F=0,874$ ,  $p=0,466$ ).

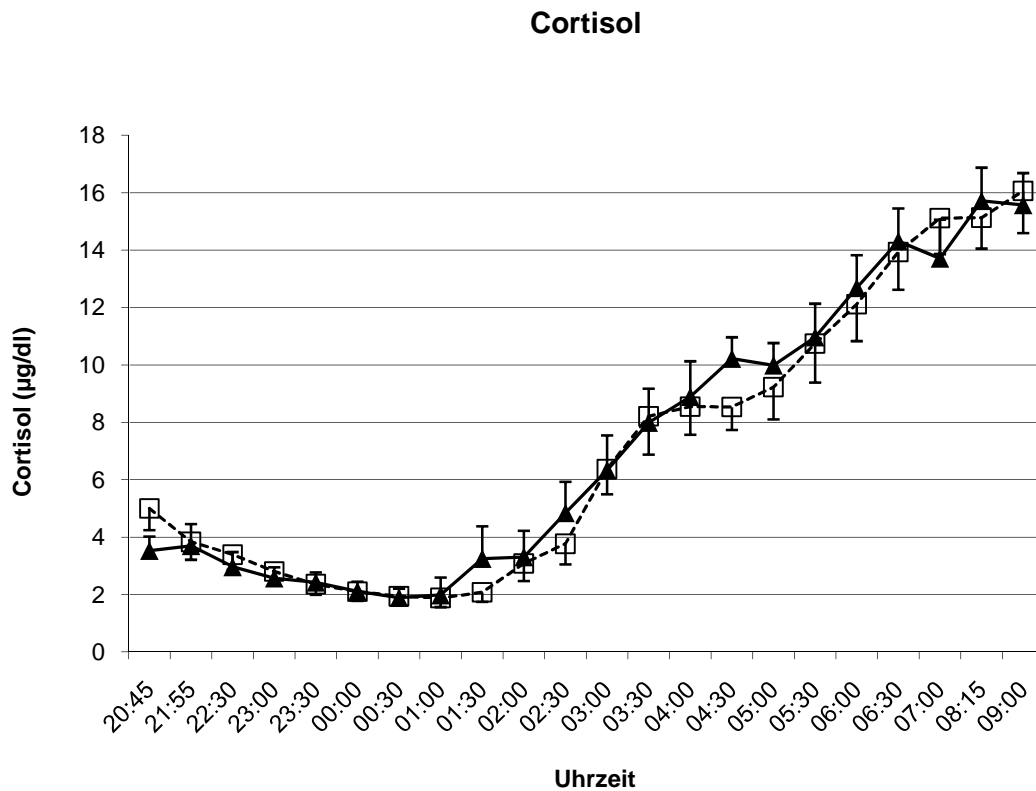


**Abb. 14:** Verlauf des ACTH-Spiegels unter der Hypocretin- (Dreiecke) und der Placebobedingung (Vierecke) (MW±SEM)



### 3.2.5. Cortisol

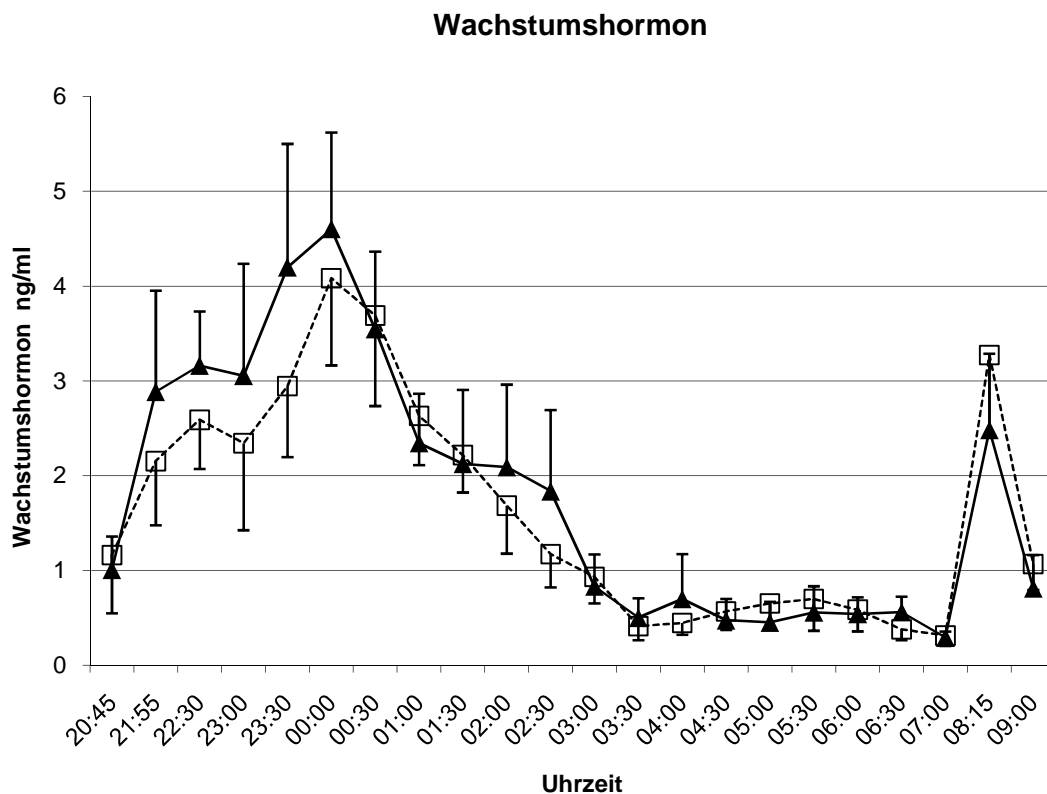
Der Verlauf der Cortisolwerte folgt dem Profil des ACTH. Nach einem leichten Abfall zu Beginn der Nacht zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg. Statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich der Konzentrationen nach Hypocretin- und Placebogabe fanden sich nicht ( $F=0,438$ ,  $p=0,859$ ). Auch eine Analyse unter Berücksichtigung des Faktors *Geschlecht* ergab keine signifikanten Unterschiede ( $F=1,188$ ,  $p=0,323$ ).



**Abb. 15:** Verlauf des Cortisolspiegels unter der Hypocretin- (Dreiecke) und der Placebobedingung (Vierecke) ( $MW \pm SEM$ )

## 3.2.6. Wachstumshormon

Der Wachstumshormon-Spiegel erreicht kurz nach Schlafbeginn um 0:00 Uhr sein Maximum und fällt dann bis zu den Morgenstunden kontinuierlich ab. Zu den letzten Messzeitpunkten zeigt sich ein zweiter, etwas niedrigerer Gipfel. Signifikante Unterschiede beim Vergleich der Konzentrationen nach Hypocretin- und Placebogabe fanden sich nicht ( $F=0,771$ ,  $p=0,536$ ). Die Analyse unter Berücksichtigung des Faktors *Geschlecht* ergab keine signifikanten Unterschiede ( $F=0,832$ ,  $p=0,501$ ).



**Abb. 16:** Verlauf des Wachstumshormon-Spiegels unter der Hypocretin- (Dreiecke) und der Placebobedingung (Vierecke) (MW±SEM)

### 3.2.7. Blutosmolalität

Die Auswertung der abends und morgens bestimmten Blutosmolalität ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Hypocretin- und der Placebobedingung ( $F=0,00$ ,  $p=0,957$ ;  $F=0,65$ ,  $p=0,431$ ). Auch zwischen den abends und morgens bestimmten Werten (Delta) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ( $F=0,26$ ,  $p=0,618$ ).

**Tab. 3:** Ergebnisse der Auswertung der Blutosmolalität (MW  $\pm$  SEM)

	<b>Hypocretin-1</b>	<b>Placebo</b>	<i>p</i>	<b>Delta</b>
	<i>MW <math>\pm</math> SEM</i>	<i>MW <math>\pm</math> SEM</i>		
<b>Blutosmolalität in mosmol/kg</b>				
<b>abends</b>	292,28 $\pm$ 1,16	295,21 $\pm$ 2,13	0,957	0,618
<b>morgens</b>	292,15 $\pm$ 1,04	295,52 $\pm$ 1,80	0,431	

### 3.3. Katecholamine im Sammelurin

Beim Vergleich der Konzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin im Sammelurin nach Hypocretin- bzw. Placebogabe fanden sich keine signifikanten Unterschiede ( $F=2,38$ ,  $p=0,147$ ;  $F=1,50$ ,  $p=0,242$ ).

**Tab. 4:** Ergebnisse der Analyse des Sammelurins (MW  $\pm$  SEM)

<b>Hypocretin-1</b>	<b>Placebo</b>	<i>p</i>
<i>MW <math>\pm</math> SEM</i>	<i>MW <math>\pm</math> SEM</i>	
<b>Adrenalin in <math>\mu</math>g</b>		
5,81 $\pm$ 0,66	4,67 $\pm$ 0,53	0,147
<b>Noradrenalin in <math>\mu</math>g</b>		
19,91 $\pm$ 1,80	15,33 $\pm$ 1,76	0,242

## 3.4. Testfrühstück

In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse des Testfrühstücks dargestellt. Der Vergleich der aufgenommenen Gesamtkalorien, Kohlenhydrate, Proteine und Fette in beiden Bedingungen lieferte keine signifikanten Ergebnisse.

**Tab. 5:** Relevante Ergebnisse des Testfrühstücks in Kilokalorien (MW  $\pm$  SEM), (\*)  $p \leq 0,10$

<b>Hypocretin-1</b>	<b>Placebo</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<i>MW <math>\pm</math> SEM</i>	<i>MW <math>\pm</math> SEM</i>		
<b>Gesamtkalorien</b>			
990,16 $\pm$ 10,67	1071,60 $\pm$ 11,58	0,16	0,695
<b>Kohlenhydrate</b>			
446,45 $\pm$ 42,52	474,11 $\pm$ 37,77	0,26	0,616
<b>Protein</b>			
125,10 $\pm$ 10,67	147,80 $\pm$ 11,58	0,26	0,613
<b>Fett</b>			
418,62 $\pm$ 32,70	449,69 $\pm$ 33,28	2,02	0,156

### 3.5. Behaviorale Tests

#### 3.5.1. 10-Punkte-Rating

Die relevanten Ergebnisse der Mittelwerte der Punkte, welche die Probanden auf einer Skala von 1 bis 10 für *Durst* und *Müdigkeit* zu je 3 Zeitpunkten vor und nach dem Schlaf angaben, sind in der Tabelle 6 dargestellt. Beim Vergleich der Ratings der Kategorie *Durst* nach Hypocretin- und Placebogabe zeigte sich im Trend ein Unterschied zwischen den Bedingungen ( $F=2,255$ ,  $p=0,09$ ). Für die Hypocretinbedingung zeigte sich vor der Substanzgabe um 18:00 Uhr ein hochsignifikant stärkerer Durst als unter der Placebobedingung.

Der Vergleich der Ratings der Kategorien *Müdigkeit* und *Hunger* ergab insgesamt kein signifikantes Ergebnis ( $F=1,8$ ,  $p=0,151$ ;  $F=2,255$ ,  $p=0,102$ ), auch wenn die Probanden nach Hypocretingabe um 7:00 Uhr im Trend müder waren als nach Placebogabe.

**Tab. 6:** Durchschnittliche Punktzahl für Hunger, Durst und Müdigkeit unter der Hypocretin- und der Placebobedingung (MW  $\pm$  SEM), (\*)  $p \leq 0,1$ , \*\*  $p \leq 0,01$

	<b>Hypocretin-1</b>	<b>Placebo</b>	<i>p</i>
	<i>MW <math>\pm</math> SEM</i>	<i>MW <math>\pm</math> SEM</i>	
	<b>Durst</b>		
<b>18:00</b>	3 $\pm$ 0,363	2,625 $\pm$ 0,375	<b>0,002**</b>
	<b>Müdigkeit</b>		
<b>07:00</b>	5,042 $\pm$ 0,465	4,708 $\pm$ 0,471	<b>0,084(*)</b>

#### 3.5.2. EWL-K

In Tabelle 7 sind die relevanten Ergebnisse der EWL-K zusammengefasst. Nicht aufgeführte Kategorien ergaben keine signifikanten Ergebnisse. Signifikante oder tendenziell signifikante Unterschiede zwischen den Bedingungen zeigten sich für die Kategorien *Aktiviertheit* ( $F=4,169$ ,  $p=0,055$ ), *Stimmung* ( $F=4,383$ ,  $p=0,05$ ), *Erregbarkeit* ( $F=3,64$ ,  $p=0,072$ ), *Deprimiertheit* ( $F=5,851$ ,  $p=0,026$ ) und *Verträumtheit* ( $F=5,18$ ,  $p=0,035$ ).

**Tab. 7:** Mittelwerte der EWL-K unter der Hypocretin- und der Placebobedingung die abends sowie morgens ausgefüllt wurde (MW  $\pm$  SEM). (\*)  $p \leq 0,10$ , \* $p \leq 0,05$

	<b>Hypocretin-1</b>	<b>Placebo</b>	<i>p</i>	<b>Delta</b>
	<i>MW <math>\pm</math> SEM</i>	<i>MW <math>\pm</math> SEM</i>		
<b>Aktiviertheit</b>				
<b>abends</b>	3,176 $\pm$ 0,567	3,708 $\pm$ 0,601	0,383	<b>0,055(*)</b>
<b>morgens</b>	3,174 $\pm$ 0,78	3,609 $\pm$ 0,729	0,052(*)	
<b>Stimmung</b>				
<b>abends</b>	5,458 $\pm$ 0,69	5,5 $\pm$ 0,773	0,171	<b>0,05*</b>
<b>morgens</b>	3,87 $\pm$ 0,607	5,217 $\pm$ 0,776	0,306	
<b>Erregbarkeit</b>				
<b>abends</b>	1,083 $\pm$ 0,279	1,292 $\pm$ 0,269	0,233	<b>0,072(*)</b>
<b>morgens</b>	1,652 $\pm$ 0,576	1,174 $\pm$ 0,371	0,219	
<b>Deprimiertheit</b>				
<b>abends</b>	1,125 $\pm$ 0,464	1,042 $\pm$ 0,364	0,228	<b>0,026*</b>
<b>morgens</b>	1,391 $\pm$ 0,578	0,609 $\pm$ 0,254	0,126	
<b>Verträumtheit</b>				
<b>abends</b>	2,333 $\pm$ 0,461	2,042 $\pm$ 0,375	0,051	<b>0,035*</b>
<b>morgens</b>	1,478 $\pm$ 0,286	1,783 $\pm$ 0,417	0,912	

Unter der Hypocretinbedingung zeigten sich abends und morgens eine geringere *Aktiviertheit*, eine geringere *Stimmung* und eine höhere *Deprimiertheit* als unter der Placebobedingung. Die *Erregbarkeit* war unter der Hypocretinbedingung abends vermindert und morgens erhöht. Bei der Auswertung der Kategorie *Verträumtheit* zeigten sich unter der Hypocretinbedingung abends eine höhere und morgens eine geringere *Verträumtheit*.

## 3.5.3. Bipolar-Skala

In Tabelle 8 sind die relevanten Ergebnisse der Bipolar-Skala zusammengefasst. Signifikante Unterschiede zwischen den Bedingungen zeigten sich für die Kategorien *schläfrig-wach* ( $F=4,021$ ,  $p=0,009$ ), *aktiv-passiv* ( $F=2,778$ ,  $p=0,037$ ) und *matt-frisch* ( $F=3,127$ ,  $p=0,027$ ).

**Tab. 8:** Mittelwerte der Bipolarskala unter der Hypocretin- und der Placebobedingung (MW  $\pm$  SEM), \* $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$

	<b>Hypocretin-1</b>	<b>Placebo</b>	<b><i>p</i></b>
	<b><i>MW <math>\pm</math> SEM</i></b>	<b><i>MW <math>\pm</math> SEM</i></b>	
<b>4 schläfrig-wach</b>			
<b>7:00</b>	2,4167 $\pm$ 0,25	2,5 $\pm$ 0,255	<b>0,006**</b>
<b>10 aktiv-passiv</b>			
<b>7:00</b>	3,25 $\pm$ 0,169	3,125 $\pm$ 0,175	<b>0,043*</b>
<b>8:15</b>	2,625 $\pm$ 0,192	2,3333 $\pm$ 0,141	<b>0,024*</b>
<b>16 matt-frisch</b>			
<b>8:15</b>	3,125 $\pm$ 0,183	3,1667 $\pm$ 0,201	<b>0,048*</b>

Unter der Hypocretinbedingung waren die Probanden um 7:00 Uhr hochsignifikant schläfriger sowie signifikant passiver als unter der Placebobedingung.

Um 8:15 Uhr waren die Probanden unter der Hypocretinbedingung signifikant passiver und matter als unter der Placebobedingung.

## 4. Diskussion

In dieser Studie wurde die Wirkung von intranasal appliziertem Hypocretin-1 auf Vigilanz, Schlafarchitektur, Nahrungsaufnahme und metabolische Parameter untersucht. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: Nach abendlicher Hypocretin-1-Gabe zeigen die Polysomnografie eine Verminderung des Tiefschlafs und eine Verlängerung der SWS-Latenz, das 10-Punkte-Rating, die EWL-K und die Bipolarskala eine morgendliche Zunahme von Müdigkeit und Passivität. Die Leptinspiegel fallen nach Hypocretingabe bei den männlichen Probanden in der ersten Nachthälfte ab. Die Auswertung des Testfrühstücks sowie der Blutwerte für ACTH, Wachstumshormon, Blutzucker, Insulin und Cortisol ergab keine signifikanten Ergebnisse. Auch der Vergleich der Katecholaminkonzentrationen im Sammelurin und der Blutosmolalität unter den jeweiligen Bedingungen blieb ohne signifikante Unterschiede.

### 4.1. Einfluss der Hypocretin-1-Gabe auf Schlaf-Wach-Rhythmus und Aktivierung

Mehrere Studien beschreiben die aktivierende und REM- und NREM-Schlaf unterdrückende Wirkung von Hypocretin-1. Nach Injektion von Hypocretin-1 in den Liquorraum reagieren Ratten mit erhöhter Aktivität und vermindertem REM- und NREM-Schlaf (Hagan et al., 1999, Kuru et al., 2000). Beim Menschen steigert die Applikation von HCRT1- und HCRT2-Rezeptorantagonisten die Müdigkeit und vermehrt REM- und NREM-Schlaf (Brisbare-Roch et al., 2007). Die in diesem Experiment beobachtete signifikante Abnahme des Tiefschlafs und die ebenfalls signifikante Verlängerung der SWS-Latenz fügen sich in dieses Bild. Scheinbar besitzt Hypocretin auch beim Menschen eine aktivierende, den Schlaf vermindernde, Wirkung. Der Effekt auf den prozentualen Anteil des Schlafstadiums 4 ist recht klein, da auch unter Placebobedingungen der Anteil des Schlafstadiums 4 mit 2,29 % schon sehr gering war. Dies ist möglicherweise auf die ungewohnte Schlafumgebung im Schlaflabor und auf das z. T. schon fortgeschrittene Alter der Probanden zurückzuführen. Beides kann bekanntlich zu einer Verminderung des Tiefschlafs führen. Eine REM-Schlaf supprimierende Wirkung der Hypocretin-1-Applikation konnte nicht beobachtet werden. Möglicherweise ist hier die Wirkungsdauer des Hypocretin-1 zu kurz, um den überwiegend in der zweiten Nachthälfte vorkommenden REM-Schlaf zu beeinflussen. Die morgendliche Zunahme von Müdigkeit und Passivität in den behavioralen Tests nach



---

Hypocretingabe spiegelt die beeinträchtigte restaurative Funktion des Schlafes wieder. Dass Hypocretin-1 offenbar auch beim Menschen eine aktivierende, wachheitsfördernde Wirkung besitzt, lässt hoffen, dass auch eine Hypocretingabe bei Narkolepsiepatienten ihre Symptome verringern könnte.

#### 4.2. Einfluss der Hypocretin-1-Gabe auf metabolische Parameter

Bei der Auswertung der Blutproben und des Sammelurins konnte nicht bei allen Parametern ein Einfluss der Hypocretingabe nachgewiesen werden. So blieben der Glukose-, Insulin-, Cortisol- und ACTH -Spiegel sowie die Katecholaminausscheidung im Sammelurin ohne signifikante Veränderungen. Dies kann mehrere Gründe haben: entweder ist der Einfluss des Hypocretinsystems auf die genannten Parameter beim Menschen schwach ausgeprägt, oder es wären höherer Dosen, möglicherweise auch über einen längeren Zeitraum, notwendig gewesen, um hier einen Einfluss zu erzielen.

Im Tierexperiment konnte eine Aktivierung der HHN-Achse nach peripherer und zentraler Applikation von Hypocretin-1 mehrfach nachgewiesen werden (Kuru et al., 2000, Russell et al., 2001, Mazzocchi et al., 2001). Möglicherweise steht diese mit den erhöhten Glukosewerten, die ebenfalls in Tierexperimenten nachgewiesen werden konnten, im Zusammenhang (Nowak et al., 2000, Ouedraogo et al., 2003). Bezüglich des Insulinspiegels nach Hypocretin-1-Gabe liegen widersprüchliche Studienergebnisse vor. Hier ist eine Steigerung ebenso wie eine Senkung des Insulinspiegels beobachtet worden (Switonska et al., 2002, Ouedraogo et al., 2003, Ehrström et al., 2005). Um zu klären, welchen Einfluss das Hypocretinsystems beim Menschen auf die HHN-Achse und den Glukosehaushalt besitzt, sind weitere Experimente notwendig, möglicherweise mit einer erhöhten Probandenzahl und höheren Hypocretindosen. Auch eine Beschränkung des Probandenkollektivs auf junge männliche Nichtraucher zur Verkleinerung der Varianz wäre hier sinnvoll.

Auf den Wachstumshormon-Spiegel hatte die Hypocretin-1-Gabe keinen statistisch signifikanten Effekt. Direkte Interaktionen zwischen Hypocretin-1-Gabe und Wachstumshormon sind bisher auch nicht beschrieben worden. Die erwartete Supprimierung des Wachstumshormon durch die leichte Verschlechterung des Schlafs aufgrund der Hypocretin-1-Gabe konnte nicht beobachtet werden. Möglicherweise war hier der Effekt auf den Schlaf zu klein, um sich auf den Wachstumshormon-Spiegel auszuwirken.

Die deutlichsten Effekte der Hypocretingabe sind bei den Leptinspiegeln der männlichen Probanden zu finden. Hier führte die Hypocretingabe zu signifikant und hochsignifikant tieferen Leptinspiegeln in der ersten Nachthälfte. Es stellt sich die Frage, über welche Mechanismen die Hypocretingabe den Leptinspiegel beeinflusst. Mehrere Wege sind hier denkbar. Zum einen könnte die leichte Verschlechterung des Schlafs die Leptin-Konzentration gesenkt haben, wie es in vorangehenden Studien nach teilweisem Schlafentzug beobachtet worden ist (Spiegel et al., 2004a). Allerdings war die Einschränkung der Schlafqualität in der vorliegenden Studie relativ gering, und es ist fraglich, ob die Senkung der Leptin-Konzentrationen in der ersten Nachthälfte durch sie zu erklären ist. Hypocretin könnte nach intranasaler Applikation auch direkt ins Blut übergehen und an den Fettzellen eine verminderte Freisetzung von Leptin vermitteln. Die Möglichkeit des direkten Übertritts in die Zirkulation zeigen Daten von Hallschmid et al. Nach intranasaler Hypocretin-1-Gabe konnte ein Gipfel in den Hypocretin-Plasmakonzentrationen nachgewiesen werden (Hallschmid et al., unveröffentlichte Daten). Ehrström et al. konnten zeigen, dass eine periphere Hypocretin-1-Gabe beim Menschen zu einer Senkung der Leptinspiegel führt (Ehrström et al., 2005).

Einen weiteren Weg, über den die intranasale Hypocretingabe Einfluss auf die Leptinspiegel haben könnte, beschreibt Buettner et al. Die zentrale Infusion von Leptin in den medio-basalen Hypothalamus von Ratten führte ohne Aktivierung des STAT3-Signalwegs, über den Leptin nach peripherer Gabe seine Wirkungen auf die Lipogenese ausübt, zu einer Inhibition der Lipogenese des weißen Fettgewebes. Dieser Effekt konnte durch sympathische Desinnervation des Fettgewebes aufgehoben werden (Buettner et al., 2008). Offensichtlich erfolgt die zentrale Kontrolle der Fettspeicher nicht nur über Hormone und Substrate, sondern auch über das autonome Nervensystem. Hypocretin könnte auch über diese Mechanismen Einfluss auf die Freisetzung von Leptin aus dem Fettgewebe haben. Wie der Effekt von Hypocretin auf den Leptinspiegel in diesem Experiment vermittelt ist, kann jedoch nicht beantwortet werden. Ebenso bleibt unklar, warum Hypocretin nur bei den männlichen Probanden zu einer Senkung des Leptinspiegel in der ersten Nachthälfte geführt hat. Leptin wird bekanntlich direkt proportional zur Fettmasse sezerniert. Der BMI von Männern und Frauen war jedoch annähernd gleich (Männer:  $27,71 \pm 3,02 \text{ kg/m}^2$ ; Frauen:  $27,63 \pm 3,52 \text{ kg/m}^2$ , jeweils  $\text{MW} \pm \text{SEM}$ ). Möglicherweise spielen bei den Frauen zyklusabhängige Faktoren eine Rolle, die trotz der Durchführung der Experimente in einem vierwöchigen Abstand nicht ganz ausgeschlossen werden können. Auch gestalteten

sich die nächtlichen Blutentnahmen bei den Frauen insgesamt schwieriger, sodass die geringere Datenzahl hier möglicherweise statistisch signifikante Ergebnisse verhindert hat.

Wie beeinflusst das Hypocretinsystem nun die Leptinspiegel und den Metabolismus? Hier scheinen sich akute und chronische Effekte zu unterscheiden. In diesem und in einem weiteren Experiment führte die einmalige Gabe von Hypocretin zu niedrigeren Leptinspiegeln beim Menschen (Ehrström et al., 2005). Doch auch ein chronischer Hypocretinmangel, wie er z. B. bei der Narkolepsie vorkommt, führt zu signifikant niedrigeren Leptinspiegeln (Kok et al., 2002). Niedrige Leptinspiegel signalisieren dem ZNS leere Fettspeicher und wirken über eine Steigerung der Nahrungsaufnahme anabol. Auch wenn die Hypocretingabe zu einer Steigerung der Nahrungsaufnahme führt, scheinen erhöhte Hypocretinspiegel langfristig jedoch katabol zu wirken. Daten aus Experimenten an Ratten mit einer Hypocretinüberexpression legen dies nahe. Die Ratten mit höheren Hypocretinspiegeln waren hier deutlich resistenter gegen ein durch Nahrungsüberangebot induziertes Übergewicht (Funato et al., 2009). Auch dass Narkoleptiker, die einen Hypocretinmangel aufweisen, trotz Hypophagie sehr häufig übergewichtig sind (Schuld et al. 2000, Dahmen et al., 2001, Kok et al., 2003) und dass adipöse Probanden niedrigere Hypocretinspiegel im Vergleich zu Gesunden besitzen (Adam et al., 2002), spricht für eine insgesamt katabole Wirkung des Hypocretins. Die Erkenntnis, dass Hypocretin orexigen und zugleich katabol wirkt, zeigt, dass das Hypocretinsystem eine hochkomplexe Rolle innerhalb der Regulation metabolischer Prozesse und der Regulation der Nahrungsaufnahme besitzt, die es weiter zu erforschen gilt.

#### 4.3. Einfluss der Hypocretin-1-Gabe auf Hunger, Durst und Nahrungsaufnahme

Die Auswertung des Testfrühstücks ergab keine signifikanten Ergebnisse. Auch das 10-Punkte-Rating ergab keine signifikanten Veränderungen bei den Merkmalen *Hunger* oder *Durst*.

Seit der Entdeckung des Hypocretinsystems wird seine physiologische Rolle mit der Steigerung der Nahrungsaufnahme in Verbindung gebracht (Sakurai et al., 1998). So beschreiben viele Studien an Nagern eine Steigerung der Nahrungsaufnahme nach zentraler Hypocretin-1-Applikation (Sakurai et al., 1998, Yamanaka et al., 1999, Edwards et al., 1999). In manchen Studien an Nagern war jedoch kein Effekt auf die Nahrungsaufnahme nach zent-

raler Hypocretin-1-Gabe nachweisbar (Ida et al., 1999). In einer Studie an den phylogenetisch höheren Affen hatte die Hypocretin-1-Gabe sogar appetitmindernde Effekte (Remsey et al., 2005). Möglicherweise existiert hier ein Spezies-spezifischer Effekt, und die Rolle des Hypocretins in der Regulation der Nahrungsaufnahme hat sich im Laufe der Evolution vermindert oder möglicherweise sogar umgekehrt. Unterstützt wird diese These von einer Studie an menschlichen Probanden, die von Ehrström et al. durchgeführt wurde. Nach intravenöser Hypocretin-1-Applikation konnte hier keine Veränderung der Ratings für *Hunger* festgestellt werden (Ehrström et al., 2005). Allerdings ist nicht klar, ob Hypocretin-1 nach peripherer Applikation die Bluthirnschranke überwindet.

Denkbar ist auch, dass die Wirkungen von Hypocretin auf die Nahrungsaufnahme beim Menschen kurzfristigerer oder langfristigerer Natur sind. So hätte das Testfrühstück entweder dichter an der Hypocretingabe liegen müssen, da die Halbwertszeit möglicherweise zu kurz ist, um am nächsten Morgen noch einen Effekt zu erzielen, oder die Hypocretingabe hätte über mehrere Tage erfolgen müssen, um die Nahrungsaufnahme zu beeinflussen. Weitere Experimente mit einem veränderten Studiendesign und einem homogeneren Probandenkollektiv sind hier notwendig, um den Einfluss des Hypocretinsystems auf die Nahrungsaufnahme des Menschen besser beurteilen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Wirkung einer abendlichen intranasalen Hypocretin-1-Gabe auf Schlafarchitektur, Nahrungsaufnahme und metabolische Parameter. Seit der Entdeckung des Hypocretinsystems wird seine Rolle mit der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Schlaf-Wach-Rhythmus in Verbindung gebracht. Fast alle Studien erfolgten jedoch bisher an Nagern. Inwieweit die dort erlangten Erkenntnisse auf den Mensch übertragbar sind, war Gegenstand dieser Studie.

Die Untersuchung erfolgte an 12 weiblichen und 14 männlichen gesunden Probanden. Nach einer Eingewöhnungsnacht im Schlaflabor folgten zwei Experimentalnächte, in denen entweder Hypocretin-1 oder Placebo intranasal verabreicht wurde. Die Zuordnung zur jeweiligen Bedingung erfolgte randomisiert und doppelblind. Neben behavioralen Tests zur Erfassung von Hunger, Durst und Müdigkeit wurde über den Versuch 22 Mal Blut zur Bestimmung von Blutzucker, Insulin, ACTH, Cortisol, Leptin und HGH abgenommen und ein Schlaf-EEG abgeleitet. Die über die Nacht ausgeschütteten Katecholamine wurden im Sammelurin bestimmt. Der Versuch endete mit einem Testfrühstück zur Bestimmung der morgendlichen Kalorienaufnahme.

Die Hypocretingabe führte zu einer signifikanten Reduktion des Tiefschlafstadiums S4. Auch die Latenz bis zum Eintreten des Tiefschlafs (SWS-Latenz) war unter der Hypocretinbedingung signifikant verlängert. In den morgendlichen behavioralen Tests zeigte sich nach Hypocretingabe eine signifikante Zunahme von Müdigkeit und Passivität.

Die Leptinspiegel der männlichen Probanden war nach Hypocretingabe in der ersten Nachthälfte signifikant und hochsignifikant niedriger als unter der Placebobedingung. Die Auswertung des Testfrühstücks ergab keine signifikanten Ergebnisse. Auch die morgendlichen Hunger-Ratings zeigten keinen Unterschied zwischen den Bedingungen

Die Ergebnisse belegen, dass das Hypocretinsystem auch beim Menschen Einfluss auf die Regulation von Schlaf-Wach-Rhythmus und metabolischen Parametern besitzt und insbesondere bei Männern die nächtliche Leptinsekretion zu supprimieren scheint. Zukünftige Studien sollten diese Ergebnisse erweitern und insbesondere ihre klinische Relevanz bei narkoleptischen Patienten erheben.

## 6. Literaturverzeichnis

Adam JA, Menheere PP, van Dielen FM, Soeters PB, Buurman WA, Greve JW. Decreased plasma orexin A levels in obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, 26(2), 274-276, (2002)

Adamantis A, de Lecea L: The hypocretins as sensor for metabolism and arousal. *J Physiol.*, 587(1), 33-40, (2009)

AWMF online: S1 Leitlinie Narkolepsie (2008)

Ayas NT, White DP, Al Delaimy WK, Manson JE, Stampfer MJ, Speizer FE, Patel S, Hu FB: A prospective study of self-reported sleep duration and incident diabetes in women. *Diabetes Care*, 26, 380-384, (2003)

Berger RJ, Phillips NH: Energy conservation and sleep. *Behav Brain Res.*, 69(1-2), 65-73, (1995)

Berghöfer A, Pischon T, Reinhold T, Apovian CM, Sharma AM, Willich SN: Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Public Health*, 8:200, (2008)

Born J, Lange T, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Fehm HL: Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to human brain. *Nat Neurosci.*, 5(6), 514-516, (2002)

Brisbare-Roch C, Dingemans J, Koberstein R, Hoever P, Aissaoui H, Flores S, Mueller C, Nayler O, van Gerven J, de Haas SL, Hess P, Qui C, Buchmann S, Scherz M, Weller T, Fischli W, Clozel M, Jenk F: Promotion of sleep by targeting the orexin system in rats, dogs and humans. *Nat Med.*, 13(2), 150-155 (2007)

Buettner C, Muse ED, Cheng A, Chen L, Scherer T, Poci A, Su K, Cheng B, Li X, Harvey-White J, Schwartz GJ, Kunos G, Rosetti L: Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central STAT3-independent mechanisms. *Nat Med.*, 14(6), 667-675, (2008)

Burdakov D, Gerasimenko O, Verkhratsky A: Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *J Neurosci.*, 25(9), 2429-2433, (2005)

Burdakov D, Jensen LT, Alexopoulos H, Williams RH, Fearon IM, O'Kelly I, Gerasimenko O, Fugger L, Verkhratsky A: Tandem-pore K<sup>+</sup> channels mediate inhibition of orexin neurons by glucose. *Neuron*, 50, 711-722, (2006)

Challet E, Pévet P, Malan A: Effect of prolonged fasting and subsequent refeeding on free-running rhythms of temperature and locomotor activity in rats. *Behav Brain Res.*, 84, 275-284, (1997)

Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M: Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell*, 98(4), 437-51, (1999)

- Cipolli C: Sleep, dreams and memory: an overview. *J. Sleep Res.*, 4, 2-9, (1995)
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, Caro JF: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.*, 334, 292-295, (1996)
- Dahmen N, Bierbauer J, Kasten M: Increased prevalence of obesity in narcoleptic patients and relatives. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*, 251, 85-89, (2001)
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yangisawa M, Nakazato M: Orexins, orexigenic hypothalamic peptides interact with autonomic neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci., USA* 96, 748-753, (1999)
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao XB, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg ELF, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG: The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *PNAS*, 95, 322-327 (1998)
- Deadwyler SA, Porrino L, Siegel JM, Hampson RE: Systemic and nasal delivery of orexin-A (hypocretin-1) reduces the effects of sleep deprivation on cognitive performance in nonhuman primates. *J Neurosci.*, 27(52), 14239-14247, (2007)
- Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH: Intranasal drug targeting of hypocretin-1 (orexin-A) to the central nervous system. *J Pharm Sci.*, 98(7), 2501-2515, (2009)
- Diekelmann S, Born J: The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci.*, Epub ahead of print, (2010)
- Edwards CMB, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR: The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol.*, 160, R7-R12, (1999)
- Ehrström M, Gustafsson T, Finn A, Kirchgessner A, Grybäck P, Jacobsson H, Hellström PM, Näslund E: Inhibitory effect of exogenous orexin A on gastric emptying, plasma leptin, and the distribution of orexin and orexin receptors in the gut and pancreas in man. *J Clin Endocrinol Metab.*, 90(4), 2370-2377, (2005)
- Estabrooke IV, McCarthy MT, Ko E, Chou TC, Chemelli RM, Yanagisawa M, Saper CB, Scammell TE: Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state. *J Neurosci.*, 21(5), 1656-1662, (2001)
- Fabricatore AN, Wadden TA: Obesity, *Annu Rev Clin Psychol.*, 2, 357-377, (2006)
- Funato H, Tsai AL, Willie JT, Kisanuki Y, Williams SC, Sakurai T, Yanagisawa M: Enhanced orexin receptor-2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity. *Cell Metabol.*, 9, 64-76, (2009)

- Green CB, Douris N, Kojima S, Strayer CA, Fogerty J, Lourim D, Keller SR, Besharse JC: Loss of nocturnin, a circadian deadenylase, confers resistance to hepatic steatosis and diet-induced obesity. *PNAS*, 104(23), 9888-9893, (2007)
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wettam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DNC, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N: Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci., USA* 96, 10911–10916 (1999)
- Hanson LR, Martinez PM, Taheri S, Kamsheh L, Mignot E, Frey WH: Intranasal administration of Hypocretin-1 (orexin A) bypasses the blood-brain barrier and targets the brain: a new strategy for the treatment of narcolepsy. *Drug Del Technol.*, 4 (4),66-71, (2004)
- Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T: Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia and obesity. *Neuron*, 30, 345-354, (2001)
- Horne J: *Why we sleep: The functions of sleep in humans and other mammals.* Oxford University Press, Oxford England (1988)
- Horvath TL, Diano S, van den Pol AN: Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: an novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci.*, 19(3), 1072-1087, (1999)
- Ida T, Nakahara K, Katayama T, Murakami N, Nakazato M: 1999; Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite-stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide Y, on the various behavioural activities of rats. *Brain Res.*, 821(2), 526-529, (1999)
- Illum L: Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur J Pharm Sci.*, 11, 1-18, (2000)
- Jacobs BL: Serotonin and behaviour: emphasis on motor control. *J Clin Psychiatry*, 52, 17-23, (1991)
- John J, Wu MF, Siegel JM: Systemic administration of hypocretin-1 reduces cataplexy and normalizes sleep and waking durations in narcoleptic dogs. *Sleep Research Online*, 3(1), 23-28, (2000)
- Kanbayashi T, Inoue Y, Chiba S, Aizawa R, Saito Y, Tsukamoto H, Fujii Y, Nishino S, Shimizu T: CSF hypocretin-1 (orexin A) concentrations in narcolepsy with and without cataplexy and idiopathic hypersomnia. *J Sleep Res.*, 11, 91-93, (2002)
- Kastin AJ, Ackerstrom V: Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *JPET*, 289(1), 219-223, (1999)



- Kayaba Y, Nakamura A, Kasuya Y, Ohuchi T, Yanagisawa M, Komuro I, Fokuda Y, Kuwaki T: Attenuated defence response and low basal blood pressure in orexin knock-out mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 285, R581-R593, (2003)
- Kennedy GC: The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.*, 140(901), 578-96, (1953)
- Kiashchenko LI, Mileykovskiy BY, Lai YY, Siegel JM: Increased and decreased muscle tone with Orexin (Hypocretin) microinjections in locus coeruleus and pontine inhibitory area. *J Neurophysiol.*, 85, 2008-2016, (2001)
- Kishi T, Elmquist JK: Body weight is regulated by the brain: a link between feeding and emotion. *Mol Psychiatry*, 10(2), 132-146, (2005)
- Kok SW, Meinders AE, Overeem S, Lammers GJ, Roelfsema F, Fröhlich M, Pijl H: Reduction of plasma leptin levels and loss of its circadian rhythmicity in hypocretin (orexin)-deficient narcoleptic humans. *J Endocrinol Metab.*, 87(2), 805-809, (2002)
- Kok SW, Overeem S, Visscher TL, Lammers GJ, Seidel JC, Pijl H, Meinders AE: Hypocretin deficiency in narcoleptic humans is associated with abdominal obesity. *Obesity Res.*, 11 (9), 1147-1154, (2003)
- Komaki G, Matsumoto Y, Nishikata H, Kawai K, Nozaki T, Takii M, Sogawa H, Kubo C: Orexin-A and leptin change inversely in fasting non-obese subjects. *Eur J Endocrinol.*, 144, 645-651, (2001)
- Kuru M, Ueta Y, Serino R, Nakazato M, Yamamoto Y, Shibuya I, Yamashita H: Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport*, 11(9), 1977-80, (2000)
- Lange T, Perras B, Fehm HL, Born J: Sleep enhances the human antibody response to hepatitis A vaccination. *Psychosom Med.*, 65(5):831-835, (2003)
- Levit DR, Teilbaum P.: Somnolence akinesia, and sensory activation of motivated behaviour in the lateral hypothalamic syndrome. *Proc Natl Acad Sci. USA* 72, 2819-2823, (1975)
- Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qui X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E: The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*, 98, 365-376, (1999)
- Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK: Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol.*, 435(1), 6-25, (2001)
- Masuhr KF, Neumann M: *Duale Reihe Neurologie*. 6. Aufl., Thieme, Stuttgart, (2007)
- Mayer J: Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. *Ann N Y Acad Sci.*, 63(1), 15-43, (1955)
- Mazzocchi G, Malendowicz LK, Gottardo L, Aragona F, Nussdorfer GG: Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of the

- adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab.*, 86(2), 778-782, (2001)
- McGought JL, Cahill L, Roozendaal B: Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems. *Proc Natl Acad Sci., USA* 93, 13508-13514, (1996)
- Melanson KJ, Westerterp-Plantenga MS, Saris WH, Smith FJ, Campfield LA: Blood glucose patterns and appetite in time-blinded humans: carbohydrate versus fat. *Am J Physiol.*, 277, 337-345, (1999)
- Mieda M, Willie JT, Hara J, Sinton CM, Sakurai T, Yanagisawa M: Orexin peptides prevent cataplexy and improve wakefulness in an orexin neuron-ablated model of narcolepsy in mice. *PNAS*, 101(13), 4649-4654, (2004)
- Mignot E, Hayduk R, Black J, Grunet FC, Guilleminault C: HLA DQB1 \*0602 is associated with cataplexy in 509 narcoleptic patients. *Sleep*, 20 (11), 1012-1020, (1997)
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW: Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443, 289-295, (2006)
- Nakabayashi M, Suzuki T, Takahashi K, Totsune K, Muramatsu Y, Kaneko C, Date F, Takeyama J, Darnel AD, Moriya T, Sasano H: Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol Cell Endocrinol.*, 205(1-2), 43-50, (2003)
- National Sleep Foundation: Sleep in America Poll. National Sleep Foundation Washington DC, (2009)
- Nilsson PM, Nilsson JA, Hedblad B, Berglund G: Sleep disturbance in association with elevated pulse rate for prediction of mortality – consequences of mental strain? *J Intern Med.*, 250, 521-529, (2001)
- Nishino S, Ripley B, Overeem S, Nevimalova S, Lammers GJ, Vankova J, Okun M, Rogers W, Brooks S, Mignot E: Low cerebrospinal fluid hypocretin (orexin) and altered energy homeostasis in human narcolepsy. *Ann Neurol.*, 50(3), 381-388, (2001)
- Nowak KW, Maćkowiak P, Świtońska MM, Fabiś M, Malendowicz LK: Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Life Sci.*, 66(5), 449-454, (2000)
- Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM: Prevalence of overweight and obesity in the United States 1999-2004. *JAMA*, 295(13), 1549-1555, (2006)
- Olerup O, Schaffer M, Hillert J, Sachs C: The narcolepsie-associated DRw15,DQw6,Dw2 haplotype has no unique HLA-DQA or –DQB restriction fragments and does not extend to the HLA-DP subregion. *Immunogenetics*, 32, 41-44, (1990)
- Ouedraogo R, Näslund E, Kirchgessner AL: Glucose regulates the release of orexin-A from the endocrine pancreas. *Diabetes*, 52, 111-117, (2003)

- Pardrige WM: The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *Neuro Rx.*, 2(1), 3-14, (2005)
- Pedrazzoli M, D'Almeida V, Martins PJ, Machado RB, Ling L, Nishino S, Tufik S, Mignot E: Increased hypocretin-1 in cerebrospinal fluid after REM sleep deprivation. *Brain Res.*, 995, 1-6, (2004)
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS: Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci.*, 18(23), 9996-10015, (1998)
- Plihal W, Born J: Effects of early and late nocturnal sleep on declarative and procedural memory. *Massachusetts Institute of Technology*, 9:4, 534-547, (1997)
- Ramsey JJ, Kemnitz JW, Newton W, Hahopian K, Patterson TA, Swick AG: Food intake in rhesus monkeys following central administration of orexins. *Reg Peptides*, 124, 209-214, (2005)
- Rechtschaffen A, Kales A: A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. *Brain Information Services*, (1968)
- Ripley B, Overeem S, Fujiki N, Nevsimalova S, Uchino M, Yesavage J, Di Monte D, Dohi K, Melberg A, Lammers GJ, Nishida Y, Roelandse FWC, Hungs M, Mignot E, Nishino S: CSF hypocretin/orexin levels in narcolepsy and other neurological conditions. *Neurology*, 57, 2253-2258, (2001)
- Russel SH, Small CJ, Dakin CL, Abbott CR, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR: The central effects of orexin-A in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in vivo and in vitro in male rats. *J Neuroendocrinol.*, 13, 561-566, (2001)
- Sakane T, Akizuki M, Taki Y, Yamashita S, Sezaki H, Nadai T: Direct drug transport from the rat nasal cavity to the cerebrospinal fluid: the relation to the molecular weight of drugs. *J Pharm Pharmacol.*, 47(5), 379-381. (1995)
- Sakane T, Akizuki M, Yamashita S, Nadai T, Hashida M, Sezaki H: The transport of a drug to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity: the relation to the lipophilicity of the drug. *Chem Pharm Bull.*, (Tokyo) 39(9), 2456-2458, (1991)
- Sakane T, Akizuki M, Yamashita S, Sezaki H, Nadai T: Direct drug transport from the rat nasal cavity to the cerebrospinal fluid: the relation to the dissociation of the drug. *J Pharm Pharmacol.*, 46(5), 378-379. (1994)
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Ichiyo M, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JRS, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu W, Terret JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M: Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92, 573-585, (1998)
- Sakurai T: The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci.*, 8(3), 171-181, (2007)

- Schmid S, Schultes B: Schlafmangel – Risikofaktor für Adipositas und Diabetes ? Diabetologie, 1, 1-6, (2006)
- Schuld A, Hebebrand J, Geller F, Pollmächer T: Increased body-mass index in patients with narcolepsy. *Lancet*, 355(9211), 1274-1275, (2000)
- Schultes B, Oltmanns KM, Kern W, Fehm HL, Born J, Peters A: Modulation of hunger by plasma glucose and metformin. *J Clin Endocrinol Metab.*, 88(3), 1133-1141, (2003)
- Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG: Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404, 661-671, (2000)
- Sekine M, Yamagami T, Handa K, Saito T, Nanri S, Kawaminami K, Tokui N, Yoshida K, Kagamimori S: A dose-response relationship between short sleeping hours and childhood obesity: results of the toyama birth cohort study. *Child Care Health Dev.*, 28, 163-170, (2002)
- Shirasaka T, Nakazato M, Matsukura S, Takasaki M, Kannan H: Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 277, R1780-R1785, (1999)
- Siegel JM: Hypocretin (Orexin): Role in normal behavior and neuropathology. *Annu Rev Psychol.*, 55, 125-148, (2003a)
- Siegel JM: Hypocretin administration as a treatment for human narcolepsy. *Sleep*, 26 (8), 932-933, (2003b)
- Spiegel K, Leproult R, L'Hermite-Balériaux M, Copinsschi G, Penev PD, Van Cauter E: Leptin levels are dependent on sleep duration: relationships with sympathovagal balance carbohydrate regulation, cortisol, and thyrotropin. *J Clin Endocrinol Metab.*, 89, 5762-5771, (2004b)
- Spiegel K, Tasali E, Penev P, Van Cauter E: Brief communication: sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Ann intern Med.*, 141, 846-850, (2004a)
- Świtońska MM, Kaczmarek P, Malendowicz LK, Nowak KW: Orexins and adipoinular axis function in the rat. *Reg Pept.*, 104, 69-73, (2002)
- Szymusiak R, McGinty D: Control of slow wave sleep by thermoregulatory mechanisms. *Prog Clin Biol Res.*, 345, 53-64; (1990)
- Taheri S, Lin L, Austin D, Young T, Mignot E: Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Med.*, 1(3), 210-217, (2004)
- Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM: Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron*, 27, 469-474, (2000)

- Thorne RG, Emory CR, Ala TA, Frey WH 2nd: Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain Res.*, 692, 278-282, (1995)
- Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM: Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett.*, 438(1-2), 71-75, (1998), Erratum in: *FEBS Lett.*, 438, 71-75, (1998)
- Walker MP, Stickgold R: Sleep-dependent learning and memory consolidation. *Neuron*, 44, 121-133, (2004)
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Tokita S, Williams SC, Kisanuki YY, Marcus JN, Lee C, Elmquist JK, Kohlmeier KA, Leonard CS, Richardson JA, Hammer RE, Yanagisawa M: Distinct narcolepsy syndromes in orexin receptor-2 and orexin null mice: molecular genetic dissection of non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron*, 38, 715-730, (2003)
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M: To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci.*, 24, 429-458, (2001)
- Woods SC, Seeley RJ, Porte Jr. D, Schwartz MW: Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, 280, 1378-1383, (1998)
- Wu MF, John J, Maidment N, Lam HA, Siegel JM: Hypocretin release in normal and narcoleptic dogs after food and sleep deprivation, eating, and movement. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 283(5), 1079-1086, (2002)
- Yamada H, Okumura T, Motomura W, Kobayashi Y, Kohgo Y: Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats. *Biochem Biophys Res Commun.*, 267, 527-531, (2000)
- Yamanaka A, Beukmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T: Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*, 38, 701-713, (2003)
- Yamanaka A, Sakurai T, Katsumoto T, Yanagisawa M, Goto K: Chronic intracerebroventricular administration of Orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Res.*, 849, 248-258, (1999)
- Zhang W, Sakurai T, Fukuda Y, Kuwaki T: Orexin neuron-mediated skeletal muscle vasodilation and shift of baroreflex during defence response in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 290, R1654-R1663, (2006)
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-432 (1994)

## 7. Anhang

### 7.1. Aufklärungsbogen

#### **Die Wirkung von Orexin A auf den Nachtschlaf**

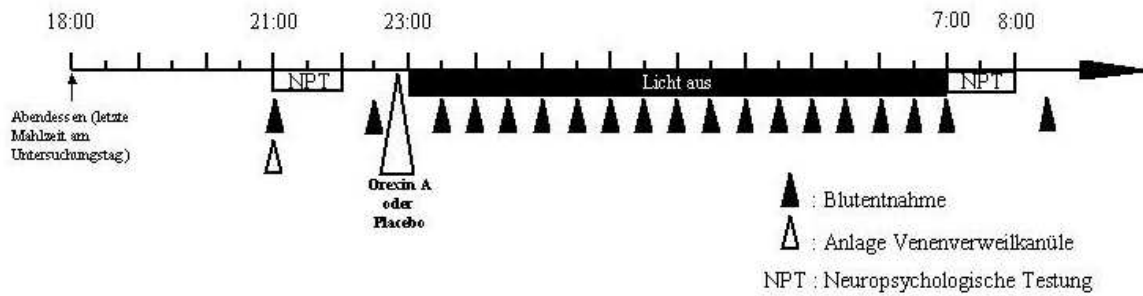
Sehr geehrte/r Versuchsteilnehmer/in,

in dieser Studie geht es um die Wirkung von Orexin A auf den Schlaf. Im Folgenden informieren wir Sie über den wissenschaftlichen Hintergrund und den geplanten Ablauf der Studie.

Ihnen wird bei diesem Versuch das körpereigene Orexin A in Form eines Nasensprays verabreicht. Orexin A ist ein Botenstoff im Zentralnervensystem; es wird überwiegend im menschlichen Hirn produziert. Aus Tierexperimenten ist bekannt, dass Orexin A eine Rolle im Energiehaushalt und bei der Schlafregulation des Organismus spielt. Neue Erkenntnisse über Wirkungsweise und mögliche Anwendungen von Orexin A könnten zur Aufklärung der Entstehung und zur Entwicklung nebenwirkungsarmer Therapien von Störungen der Schlaf-Wach-Regulation wie Narkolepsie führen. Aufgrund der verwendeten Menge gehen wir davon aus, dass keine unerwarteten peripheren Nebenwirkungen auftreten. Bei entsprechender Allergieneigung können jedoch Überempfindlichkeitsreaktionen bis hin zu Atemnot und Bewusstlosigkeit auftreten. Es ist nicht zu erwarten, dass sich bei der hier gewählten Dosis andere Risiken realisieren, da in Vorstudien nach der Gabe von Orexin A keine Nebenwirkungen beobachtet wurden. Durch eine begleitende ärztliche Überwachung mit potenzieller Interventionsmöglichkeit können wir auch auf ein unerwartetes Ereignis wie z.B. eine allergische Reaktion adäquat reagieren.

Im Rahmen der Untersuchung verbringen Sie im Abstand von etwa ein bis zwei Wochen zwei Nächte im Schlaflabor. Falls Sie in den letzten drei Monaten noch nicht in unserem Schlaflabor geschlafen haben, absolvieren Sie zusätzlich eine Eingewöhnungsnacht, die dazu dient, Sie mit den Räumlichkeiten und Abläufen im Schlaflabor vertraut zu machen und Sie an den Schlaf unter Laborbedingungen zu gewöhnen. In den Experimentalnächten erfolgt zufällig verteilt („randomisiert“) entweder die Gabe von Orexin A intranasal oder von Placebo. Dies geschieht „doppelblind“, d. h. weder Sie noch der betreuende Versuchsleiter wissen, welches Präparat zu welchem Zeitpunkt verabreicht wird.

Die Untersuchungen laufen an den Studientagen wie in der folgenden Abbildung dargestellt ab (wobei der Zeitpunkt des Zubettgehens und der Präparatgabe an Ihre Schlafgewohnheit angepasst werden kann, wenn Sie gewohnt sind, deutlich vor 23:00 zu schlafen).



Am Versuchstag nehmen Sie bitte ein Ihren Essgewohnheiten entsprechendes, reguläres Mittagessen ein. Am Abend vor der Schlafableitung wird Ihnen um 18:00 ein standardisiertes Abendessen gereicht, das auch die letzte Mahlzeit am Untersuchungstag sein soll. Zwei Stunden vor der individuellen normalen Schlafensgezeit (im oben gezeigten Beispiel 23:00) erfolgt die Anlage der Ableitelektroden und eines Venenverweilkatheters in eine Armvene, über den im Folgenden die Blutentnahmen erfolgen.

Im Anschluss daran findet eine Neuropsychologische Testung (NPT) statt, in der die Befindlichkeit des Studienteilnehmers dokumentiert wird und die Lernphase der Gedächtnistests durchgeführt wird. Diese Testung dauert ca. 1 Stunde. Nach Abschluss der Testung wird entweder Orexin A als Nasenspray oder Placebo verabreicht. Anschließend gehen Sie zu Bett und schlafen, wobei mittels der angebrachten Elektroden die Hirnströme (EEG), die Muskelaktivität verschiedener Muskel (EMG), die Augenbewegungen (EOG) sowie der Herzschlag (EKG) registriert werden. Dies ermöglicht uns eine Beurteilung der Quantität der durchlaufenen Schlafstadien und somit Rückschlüsse auf die Schlafqualität. Während der Nacht werden über den Venenverweilkatheter in 30-minütigen Abständen kleinere Mengen Blut (maximal 250 ml pro Versuchsnacht) abgenommen. Dies geschieht über einen kleinen Plastikschauch („through-the-wall“-Verfahren), ohne dass Sie dafür aufgeweckt werden müssen. Die häufigen Blutentnahmen dienen dazu, Veränderungen in den hormonellen Botensystemen im Laufe der Nacht zu messen. Die Risiken der Blutentnahme unterscheiden sich nicht von denen der Routine-Blutentnahme: kleine Blutergüsse, Fehlpunktionen mit Verletzungen von Nerven und Gefäßen (mit Bildung von Blutergüssen, Venenentzündung, ggf. Armvenenthrombose). Diese Nebenwirkungen treten aber bei sachgerechter Durchführung extrem selten auf. Zum Freihalten der Kanüle wird über eine Infusionspumpe kontinuierlich Kochsalzlösung mit eventuell einer niedrigen Menge Heparin infundiert. Dies kann in seltenen Fällen zu allergischen Reaktionen führen. Deshalb ist es ganz wichtig, dass Sie uns sagen, ob bei Ihnen der Verdacht auf eine Unverträglichkeit von Heparin besteht oder womöglich bei früheren Heparinungen bereits Beschwerden aufgetreten sind. Am Morgen erfolgt ebenfalls eine erneute neuropsychologische Testung, in der Ihre Befindlichkeit dokumentiert wird und das am Vortag Gelernte abgerufen wird. Abgeschlossen wird jede Studiennacht mit einem Frühstück.

Das Klinikum der Universität haftet im Falle einer Schädigung nach den allgemeinen Haftungsgrundsätzen des Universitätsklinikums (UKSH). Für die Teilnahme an dieser Untersuchung erhalten Sie 55 Euro pro Versuchsnacht und 40 Euro für eine Eingewöhnungsnacht. Die während der Studie von Ihnen erhobenen Daten werden anonymisiert weiterverwendet.

---

## 8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. rer. soc. Jan Born danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die Bereitstellung aller nötigen Materialien und Räumlichkeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Manfred Hallschmid für die überaus engagierte und geduldige Betreuung meiner Doktorarbeit, von der Versuchsplanung bis zum Erstellen der Dissertationsschrift.

Auch allen Probanden, die ich hier nicht namentlich erwähnen kann, bin ich zu besonderem Dank verpflichtet.

Meiner Freundin Henriette Berndt danke ich für die geduldige Begleitung und die vielen aufmunternden Worte, die mir die Arbeit leichter von der Hand gehen ließen.

Schließlich möchte ich noch meiner Familie und besonders meinen Eltern Andreas Slemeyer und Roswitha Slemeyer danken, deren ideelle und finanzielle Unterstützung mir das Medizinstudium und diese Dissertation überhaupt erst ermöglicht haben.