

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1. Regulation der Nahrungsaufnahme

#### 2.1.1. Historische „Hunger“ – Theorien

Die Regulation der Nahrungsaufnahme hat den Menschen seit langem beschäftigt. Der römische Mediziner und Philosoph Galen (138-201 n. Chr.) lokalisierte den Magen als den Entstehungsort des Hungergefühls und schrieb die schmerzenden und nagenden Empfindungen, die nach länger anhaltenden Nahrungsentzug auftreten, wiederholten Kontraktionen dieses Organs zu. Eine der ersten neuzeitlichen Hungertheorien besagt, dass der leere Magen spezifische Hungernerven erregt (Haller, 1776). Der Neurophysiologe Sherrington (1900) beobachtete allerdings, dass selbst eine totale Denervierung des Magens keinen dominanten Einfluss auf die Regulation der Nahrungsaufnahme hat (zitiert nach Brooks et al., 1980). Magendie postulierte ein Hungerzentrum im Gehirn, das auf einen Hungerstatus im Blut anspricht (Magendie, 1839). Einen zentralen Ursprung des Hungers beschrieb erstmals Du Bois-Reymond (1910), wobei er einen vagalen und einen geweblichen Hunger unterschied (zitiert nach Brooks et al., 1980). Die „Magenkontraktionstheorie“ von Cannon und Washburn (1912) war die erste periphere Hungertheorie, die durch experimentell erhobene Daten gestützt wurde und war viele Jahre lang die vorherrschende periphere Theorie des Hungers.

Frühe Regulationsmodelle der Nahrungsaufnahme gehen von einer „Energieerschöpfung“ bzw. von einem bestimmten Defizitzustand des Organismus aus. Diesen Theorien zufolge beruht die Entstehung des Hungers auf Energieverbrauch, d.h. ein Organismus beginnt die Nahrungsaufnahme, wenn er eine bestimmte Menge an Energie umgesetzt hat und beendet sie, wenn er diese Energie wieder zurück gewonnen hat. Solche Energieverbrauchsmodelle basieren auf der Annahme, dass die Nahrungsaufnahme der zentrale Anteil der Energiehomöostase ist und der Körper über Signale verfügt, die ihm sagen, wie viel Energie im jeweiligen Moment zur Verfügung steht. So besagt die *thermostatische Theorie* der Nahrungsaufnahme, dass die Energiezufuhr vom Wärmebedarf des Körpers abhängig ist (Brobeck, 1948). Demnach würde ein Absinken der Gesamtwärmeproduktion das Hungergefühl auslösen und zu einer vermehrten Nahrungsaufnahme führen. Die Betonung einzelner, über das Blut transportierter Metaboliten mit Signalwirkung führte zu weiteren Theorien der Nahrungsaufnahmeregulation. So liegt der *lipostatischen Theorie* (Kennedy, 1953; Mayer, 1955) die Annahme zugrunde, dass ein zirkulierender Metabolit des Fettgewebes für die langfristige Regulation des gespeicherten Fettes zuständig ist. Als

Signal wird die Konzentration an freien Fettsäuren (FFS) im Blut angenommen. Wenn die zirkulierenden Anteile von FFS als Folge der Spaltung gespeicherten Fettes hoch sind, steigert der Organismus seine Nahrungsaufnahme. Sind diese niedrig, nimmt der Organismus weniger Nahrung auf (Le Magnen, 1992). Die *aminostatische Theorie* (Berg, 1978) sieht den Proteingehalt, vor allem die Aminosäurezusammensetzung der Nahrung, als Auslöser für die Hunger- bzw. Sättigungswahrnehmung an. Die *glukostatische Theorie* des Hungers (Mayer, 1955) geht davon aus, dass die Verwertungsrate von Glukose in glukosesensiblen Zellen des ZNS für die Auslösung der Nahrungsaufnahme entscheidend ist. Mayer zog die Schlussfolgerung, dass der Blutzuckerspiegel bzw. die arterio-venöse Blutzuckerdifferenz als Signal für das Gehirn fungiert, das diesem die unmittelbar verfügbare oder benötigte Energiemenge anzeigt. Mangelnde Glukoseverfügbarkeit (Hypoglykämie) und abnehmende Glukoseverwertung lösen die Nahrungsaufnahme aus, während eine postprandiale Hyperglykämie und folglich ein Anstieg der Glukoseverwertung die Nahrungsaufnahme beenden. Unterstützung erfuhr die glukostatische Theorie von Mayer durch die Entdeckung von Neuronen im ZNS, die auf Änderungen der Blutglukosekonzentration mit einer Änderung ihrer Entladungsrate reagieren (Anand et al., 1964; Oomura et al., 1964).

Die Kontrolle der Nahrungsaufnahme erfolgt wahrscheinlich nicht strikt homöostatisch, da Energiedefizitsignale stärker wirken als Überflusssignale. Erklärt werden könnte das mit evolutionären Anpassungen, die in Zeiten von Nahrungsmangel das Überleben sichern sollen. Nach der „*Thrifty genotype*“ Hypothese konnten sich in der Evolutionsgeschichte bevorzugt diese Erbanlagen durchsetzen, die die Energiespeicherung bei Mensch und Tier begünstigen. Dieser „sparsame“ Genotyp nimmt bei Verfügbarkeit von Nahrung schnell an Gewicht zu und besitzt damit in Zeiten von Nahrungsknappheit einen erheblichen Vorteil (Wendorf & Goldfine, 1991). In den modernen Industriestaaten wirken sich diese Genvarianten jedoch ungünstig aus, da sie bei gegebenem Angebot an leicht verfügbaren, energiereichen und schmackhaften Nahrungsmitteln die Fettspeicherung und somit die Entwicklung von Adipositas fördern. Aufgrund der sich in den letzten 100 Jahren entscheidend geänderten Lebensumstände erscheinen diese Erbanlagen nunmehr nicht mehr als Vorteil, sondern als Nachteil, da sie Adipositas prädisponieren.

### **2.1.2. Nahrungsaufnahme und Verhalten**

Die Nahrungsaufnahme bei Mensch und Tier wird letztlich immer durch motiviertes Verhalten realisiert. Bei der Auslösung der Nahrungsaufnahme wird durch das Zentralnervensystem (ZNS) eine Vielzahl innerer und äußerer Informationen integriert. Dazu gehören sowohl

Informationen über den Energiestoffwechsel, aber auch „äußere Anreize“ wie Geruch und Geschmack, sind bedeutend für die Auslösung von motiviertem Nahrungsverhalten, insbesondere dann, wenn das Hungergefühl nicht sehr stark ist (Schlenker et al., 1992). Andererseits wird das Nahrungsaufnahmeverhalten auch durch psychologische und soziale Faktoren beeinflusst. Die Mehrzahl der Menschen gibt an, unter Stressbedingungen weniger zu essen (Cuntz, 2002). Menschen, die depressiv sind, essen gewöhnlich weniger als Menschen in normaler Affektlage, wenn auch depressive Menschen in seltenen Fällen exzessiv essen („Kummerspeck“) (Logue, 1998). Es ist bekannt, dass Essen in Gesellschaft anderer Personen die aufgenommene Nahrungsmenge beeinflusst (de Castro, 1989). Auch kulturelle Einflüsse bestimmen beim Menschen die Art und Weise der Nahrungsaufnahme. Ebenso spielen Lern- und Gedächtnisleistungen beim Nahrungsaufnahmeverhalten eine große Rolle und sind auch bei Prozessen der Nahrungsmittelpräferenz und -aversion beteiligt (Logue, 1998). Die Nahrungsaufnahme steht auch immer im Zusammenhang mit Nahrungsselektion. Es wird die Auswahl getroffen, welche Nahrung zu welchem Zeitpunkt und in welcher Menge aufgenommen wird. Diese Verhaltensleistungen werden durch eine Vielzahl von Neurotransmittern, von Peptiden und von endokrinen Faktoren gesteuert und kontrolliert.

### **2.1.3. Hypothalamus und Nahrungsaufnahme**

Es wird zwischen kurzfristiger und längerfristiger Kontrolle der Nahrungsaufnahme unterschieden. Signale, die eine einzelne Mahlzeit initiieren, sind verschieden von denen, die sie beenden. Diese Signale interagieren mit Informationen über die langfristige Kontrolle des Energiehaushaltes und des Körpergewichts. Periphere Signale über den aktuellen Ernährungszustand erreichen das Gehirn, welches über Mechanismen zur Aufnahme dieser Informationen verfügt und diese integriert und verarbeitet. Dazu gehören alle Informationen die langfristig für die Herstellung eines Gleichgewichtszustandes zwischen Energieaufnahme und Energieumsatz notwendig sind (Schwartz et al. 2000).

Moderne Vorstellungen über die zentralnervöse Regulation der Nahrungsaufnahme reichen auf Experimente zurück, die bereits vor mehreren Jahrzehnten durchgeführt wurden. Hetherington und Ranson (1939) demonstrierten an Ratten, dass eine elektrische Stimulation des VMH die Nahrungsaufnahme hemmt und bilaterale Läsionen zur Hyperphagie führen. Ähnliche Studien im Bereich des lateralen Hypothalamus (LH) zeigten, dass elektrische Reizung die Nahrungsaufnahme sogar bei gesättigten Ratten auslöst und die Zerstörung dieses spezifischen Gebietes zur Beendigung von Wasseraufnahme und zur Nahrungsverweigerung bis hin zum Verhungern führt (Anand & Brobeck, 1951; Brobeck,

1946; Teitelbaum & Stellar, 1954). Vereinfachend wurden daher der VMH als Sättigungszentrum und der LH als Hungerzentrum beschrieben, die sich gegenseitig hemmen (Stellar, 1954). Die „*Gehirnzentren-Theorie*“ integrierte dabei die Theorien über die periphere Regulation der Nahrungsaufnahme und betrachtete den Hypothalamus als Verarbeitungszentrum peripherer Informationen. Dieses „*Dual-Center*“-Konzept von Stellar bildete den Ausgangspunkt für die Forschungen folgender Jahrzehnte.

Fortführende Untersuchungen führten schließlich zur Entdeckung weiterer hypothalamischer Strukturen und von extrahypothalamischen Gehirnarealen, deren Läsion Effekte auf das Nahrungsaufnahmeverhalten haben (zusammengefasst durch Grossmann, 1972). Diese Arbeiten und die Tatsache, dass bei den experimentell gesetzten Läsionen sowohl die Kerngebiete als auch durch die Kerngebiete leitende Nervenbahnen verletzt wurden, zeigten, dass die klassische Einteilung des LH und VMH in ein spezifisches Hunger- und ein Sättigungszentrum aufgegeben werden musste. Moderne Veröffentlichungen diskutieren detailliert die Vielzahl der an der Kontrolle der Nahrungsaufnahme beteiligten Mechanismen (Grill & Kaplan, 2002; Saper et al., 2002; Schwartz et al., 2000-2002). Man spricht nunmehr von einem die Nahrungsaufnahme regulierenden neuronalen Netzwerk, das eine Vielzahl von Gehirnregionen integriert. Dazu zählen neben mehreren hypothalamischen Kerngebieten Strukturen des Hirnstammes, das limbische System und hier insbesondere die Amygdala. Aber auch kortikale Strukturen sind an der Kontrolle der Nahrungsaufnahme beteiligt (Berthoud, 2002). Der Hypothalamus spielt dennoch nach wie vor eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle der Nahrungsaufnahme. Ihm wird derzeit eine weit komplexere, integrative Funktion bei der Rezeption und Integration von zahlreichen Signalen, die mit der Nahrungsaufnahme in Verbindung stehen beigemessen (Woods et al., 1998).

Der Hypothalamus stellt ein sehr wichtiges zentralnervöses Integrationszentrum autonomer Regelkreise dar. Er ist als integrative Instanz unter anderem an der Homöostase der Körpertemperatur (Simon et al., 1986), der zirkadianen Rhythmik (Aschoff et al., 1982), des Salz- und Wasserhaushaltes (Anderson, 1978; Bie, 1980) sowie der Nahrungsaufnahme (Leibowitz, 1980) beteiligt. Der Hypothalamus kontrolliert die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch des Organismus, indem er Informationen über den Ernährungszustand und den Energiebedarf integriert und verarbeitet. Diese funktionelle Vielfalt wird durch verschiedene Neurotransmitter und Hormone ermöglicht, die entweder einen stimulierenden oder einen hemmenden Einfluss auf die Nahrungsaufnahme haben. Orexigene und anorexigene Neuropeptide entfalten ihre Wirkungen in verschiedenen an der Energiehomöostase beteiligten Arealen des Hypothalamus (Kalra et al., 1999; Hillebrand et al., 2002; Mercer & Speakman, 2001; Schwartz et al., 2000; Woods et al., 1998).

### Hypothalamisch wirksame Stimulatoren der Nahrungsaufnahme

Neuropeptid Y (NPY) ist eines der am häufigsten vorkommenden Neuropeptide im Gehirn. Es kann überall im zentralen und peripheren Nervensystem nachgewiesen werden und ist der derzeit stärkste bekannte Stimulator der Nahrungsaufnahme. NPY wird in den medialen Zellen des Nucleus arcuatus des Hypothalamus (ARC) gebildet (Baskin et al., 1999). NPY-Neurone des ARC senden Axone zum Nucleus paraventricularis (PVN) und zum LH (Broberger et al., 1998; Elias et al., 1998). Applikationen von NPY in den LH lösen Nahrungsaufnahme aus (Stanley et al., 1993). Im PVN bewirkt NPY durch Stimulation der Insulin- und Glukocorticoidsekretion, durch Reduzierung der Thermogenese und durch Erhöhung der Lipoprotein-Lipase-Aktivität eine positive Energiebilanz und eine Auffüllung der Fettspeicher. Eine intraventrikuläre Verabreichung von NPY führt über eine gesteigerte Nahrungsaufnahme und durch eine herabgesetzte Thermogenese innerhalb weniger Tage zu einer substantiellen Zunahme der Fettmasse (Abe et al., 1989; Currie & Coscina, 1996; Stanley et al., 1986; Wahlestedt et al., 1987).

Die Endigungen der NPY-Neurone setzen zusätzlich zu NPY ein weiteres orexigenes Neuropeptid frei, das Agouti related protein (AGRP) (Hahn et al., 1998), welches offensichtlich eine ebenso große Appetit auslösende Wirkung hat wie NPY (Halmi, 1998; Zemel, 1998). Die Infusion einer sehr geringen Menge dieses Neuropeptids in den dritten Ventrikel führt bei Ratten zu einer über mehrere Tage anhaltende Nahrungsaufnahme (Lu et al., 2001). AGRP und das  $\alpha$ -Melanozyten stimulierende Hormon ( $\alpha$ -MSH), ein Hemmstoff der Nahrungsaufnahme (s.u.), binden an dieselben Rezeptoren im ARC und üben entgegengesetzte Wirkungen aus, d.h. die antagonistische Wirkung von AGRP kommt durch kompetitive Verdrängung von  $\alpha$ -MSH bei der Rezeptorbindung zustande (Ollmann et al., 1997). AGRP gilt deshalb als ein Neuropeptid, das die Feineinstellung des  $\alpha$ -MSH Systems bewirkt.

Eine deutliche, jedoch gegenüber NPY und AGRP schwächere orexigene Wirkung, zeigen das Melanin concentrating hormone (MCH) sowie die Orexine A und B. Diese Neuropeptide werden von zwei Neuronenpopulationen des LH freigesetzt. Injektionen von MCH und Orexin in den lateralen Ventrikel von Ratten und Injektionen von Orexin in den ARC lösen die Nahrungsaufnahme aus. Dieser Effekt wird vermutlich über direkte Projektionen von NPY-Neuronen des ARC auf die MCH- und Orexin-Neurone des LH induziert (Horvath et al., 1999; Muroya et al., 2004). Zusätzlich stellen Projektionen  $\alpha$ -MSH exprimierender Neurone des ARC zum LH eine Verknüpfung dieser beiden Kerngebiete her. Futterdeprivation bewirkt im LH von Ratten eine Erhöhung der Expression der mRNA beider Neuropeptide (Dube et

al., 1999; Qu et al., 1996; Sakurai et al., 1998). Darüber hinaus weisen Untersuchungen auf Interaktionen zwischen Orexinen und Glukose bzw. Insulin hin. Insulininduzierte Hypoglykämie bewirkt im LH futterdeprivierter Ratten eine Aktivierung von Orexin-Neuronen und einen Anstieg des hypothalamischen Orexin-B-Gehalts (Cai et al., 2001). Subkutane Injektionen von Orexin A führen bei Ratten zu einem Anstieg der Insulin- und Glukosekonzentrationen im Blut. Dagegen zeigt die Verabreichung von Orexin-B nur einen schwachen Effekt auf Insulin und keine Wirkung auf den Blutglukosespiegel (Nowak et al., 2000).

Das Neuropeptid Galanin ist ebenfalls ein den Appetit stimulierendes Hormon, dessen orexigene Wirkung allerdings deutlich geringer ist als die von NPY und AGRP (Gundlach & Burazin, 1998; Kalra & Horvath, 1998). Die Verteilung von Galanin produzierenden Neuronen erstreckt sich über mehrere Bereiche des Hypothalamus. Galanin wird eine besondere Rolle bei der Fettpräferenz zugesprochen.

Das Peptidhormon Ghrelin wird über das gastrointestinale System, vor allem dem Magen (Kojima et al., 1999), aber auch von Neuronen im Gehirn freigesetzt, wenn auch in wesentlich geringeren Mengen. Die relative Bedeutsamkeit des peripher und des zentral gebildeten Ghrelin ist unbekannt (Murakami et al., 2002). Zirkulierendes Ghrelin kann aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften die Blut-Hirn-Schranke (BHS) überwinden, bindet direkt an Rezeptoren im ARC und führt zu einer Sekretion von Nahrungsaufnahme stimulierenden NPY und AGRP. Es ist noch nicht geklärt, welches physiologische Signal für die Freisetzung von Ghrelin aus dem Magen verantwortlich ist. Ein weiterer Hinweis darauf, dass dieses Peptidhormon bei der Auslösung der Nahrungsaufnahme eine Rolle spielt, ist die Entdeckung von Cummings et al. (2001), dass beim Menschen der Blutspiegel von Ghrelin kurz vor jeder Mahlzeit ansteigt. Bei Ratten führen subkutane Injektionen und Infusionen von Ghrelin in zerebrale Ventrikel zu Gewichtszunahme und Verringerung des Fettstoffwechsels (Nakazato et al., 2001; Tschöp et al., 2000).

#### Hypothalamisch wirksame Hemmstoffe der Nahrungsaufnahme

Das  $\alpha$ -MSH wird ebenfalls wie die Stimulatoren der Nahrungsaufnahme NPY und AGRP von den Neuronen des ARC gebildet und gehört zum hypothalamischen melanocortinergen System, da es neben weiteren Neuropeptiden ein Spaltprodukt des Vorläufer-Proteins Proopiomelanocortin (POMC) ist. Diese Peptide üben ihre Wirkung über Melanocortin-Rezeptoren (MC3-Rezeptor, MC4-Rezeptor) aus. Patienten mit einer Mutation im POMC-Gen oder MC4-Rezeptor-Gen zeigen eine schwere und früh beginnende, extreme Adipositas

(Krude et al., 1998). Mountjoy et al. (1994) fanden an verschiedenen Orten des Gehirns, u.a. im ARC, MC-4-Rezeptoren und neben  $\alpha$ -MSH, noch einen weiteren natürlichen Liganden dieses Rezeptors, das schon beschriebene AGRP.  $\alpha$ -MSH und AGRP üben auf die MC4-Rezeptoren entgegengesetzte Wirkungen aus.  $\alpha$ -MSH wirkt als Agonist und hemmt die Nahrungsaufnahme, während AGRP als Antagonist durch kompetitive Verdrängung von  $\alpha$ -MSH die Nahrungsaufnahme aktiviert.

Das *Cocain- and amphetamin-regulated transcript* (CART) ist ein weiteres Neuropeptid des ARC mit sättigender Wirkung. CART-Neurone senden ihre Axone zu einer Reihe von Hirnregionen. Im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme sind die Projektionen zum PVN und zum LH die wichtigsten. Die Aktivität der CART-Neurone erhöht über die Verbindungen zum PVN die Stoffwechselumsatzrate und hemmt über die Verbindungen zum LH offensichtlich MCH- und Orexin-Neurone, wodurch die Nahrungsaufnahme unterdrückt wird. Darüber hinaus enthalten CART-Neurone exzitatorisch wirkende Leptin-Rezeptoren. Dies spricht dafür, dass CART-Neurone zumindest teilweise für die Sättigungsmechanismen von Leptin, des derzeit einzigen bekannten Langzeitsignals unter den Sättigungsfaktoren, verantwortlich sind.

Die Entdeckung des Peptidhormons *Leptin* (Zhang et al., 1994) war ein wichtiger Beweis für die lipostatische Theorie von Kennedy (1953), wonach dem Gehirn mitgeteilt wird, wie der langfristige Energiezustand des Körpers in Form der Fettspeicher aussieht. Leptin wird vom Fettgewebe produziert, ins Blut abgegeben und passiert über einen Transportmechanismus die Blut-Hirn-Schranke (BHS). Die Blutkonzentrationen von Leptin korrelieren mit der Menge des Körperfettgewebes. Inzwischen wird vermutet, dass Leptin außer im Fettgewebe auch im Gehirn gebildet und freigesetzt wird (Esler et al., 1998; Wiesner et al., 1999). Die Leptinsynthese wird durch Fasten gehemmt und durch Nahrungsaufnahme stimuliert. Seine Effekte auf das Nahrungsaufnahmeverhalten erzielt dieses Hormon durch direkte Bindung an hypothalamische Rezeptoren anorexigener CART/ $\alpha$ -MSH-Neurone und orexigener NPY/AGRP-Neurone (Elmquist et al., 1999; Morton & Schwartz, 2001). Fällt der Leptinspiegel bei Hunger, führt dies zu einer erhöhten Freisetzung von NPY und AGRP, während  $\alpha$ -MSH und CART im gleichen Kerngebiet absinken. NPY, POMC, AGRP und CART projizieren wiederum in den LH und regulieren dort die Synthese von MCH und Orexin, die ihrerseits die Nahrungsaufnahme stimulieren (Elias et al., 1999, Sahu et al., 1998, Smith et al., 1998).

Ein weiterer Stoff mit sättigender Wirkung im Hypothalamus ist das *Serotonin* (5-HT). 5-HT kommt im gesamten Körper, wie zum Beispiel in Thrombozyten, Mastzellen und

enterochromaffinen Zellen, vor. Nur etwa 1-2% des Gesamtserotonins wird im Gehirn gefunden. Zentrale oder periphere pharmakologische Beeinflussung von 5-HT zeigt eindeutige Effekte auf das Nahrungsaufnahmeverhalten. Wirkstoffe mit einem verstärkenden Effekt auf die serotonerge Aktivität vermindern die Nahrungsaufnahme, wohingegen Substanzen mit einer abschwächenden Wirkung auf die serotonerge Aktivität die Nahrungsaufnahme erhöhen können (Blundell, 1986). Eine periphere Gabe von 5-HT, das die BHS nicht überwinden kann, bewirkt eine Herabsetzung der Nahrungsaufnahme (Fletcher et al., 1984; Pollock et al., 1981; Simansky et al., 1992). Derselbe Effekt wird auch nach Gabe peripher wirksamer 5-HT-Agonisten beobachtet (Simansky et al., 1989). Die intraperitoneale Injektion des 5-HT Antagonisten Methysergid erhöht die Sekretion von NPY im Hypothalamus und somit die Nahrungsaufnahme (Dryden et al., 1995), was darauf schließen lässt, dass serotonerge Neurone einen hemmenden Effekt auf NPY-Neurone haben. Die Zusammenhänge zwischen zentraler und peripherer Wirkung von 5-HT auf die Nahrungsaufnahme sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Gegenwärtig wird die sättigende Wirkung von 5-HT zumeist zentralnervösen Mechanismen zugesprochen, obwohl nicht davon ausgegangen werden kann, dass die sättigende Wirkung von 5-HT ausschließlich auf zentralen Mechanismen beruht (Voigt, 2004).

Es wird vermutet, dass serotonerge Sättigungsmechanismen nicht isoliert wirken, sondern mit anderen Mechanismen interagieren. Neben Interaktionen zwischen 5-HT und Cholecystokinin werden auch Interaktionen zwischen 5-HT und Glukose vermutet, obgleich meist die Effekte von Insulin auf 5-HT untersucht wurden. So wurde gezeigt, dass Insulin unter *in vivo* Bedingungen die Freisetzung von 5-HT stimuliert und den Glukosespiegel im Hippocampus senkt. Nach peripherer Glukosegabe konnte ebenfalls eine verstärkte 5-HT-Freisetzung im Gehirn beobachtet werden (Vahabzadeh et al., 1995). 5-HT-Agonisten erhöhen ihrerseits den Blutglukosespiegel (Chaouloff & Jeanrenaud, 1987; Sugimoto et al., 2001). Allerdings existieren ebenfalls Untersuchungen, die von einem senkenden Einfluss von 5-HT auf den Blutglukosespiegel berichten (Yamada et al., 1989; Ritter et al., 2000). Darüber hinaus weisen Untersuchungen auf einen Zusammenhang zwischen Glukose und der Genexpression orexigener Faktoren hin. So stimuliert die periphere Gabe des Glukoseantimetaboliten 2-Desoxy-glukose (2-DG) die Genexpression der orexigenen Faktoren MCH im LH und NPY im ARC (Sergeyev et al., 2000). Hypoglykämie führt im LH zur Aktivierung von Orexin-Neuronen und zu einem Anstieg des Orexin-B-Gehalts (Cai et al., 2001).



## 2.2. Glukose und Nahrungsaufnahme

Glukose und ihre phosphorylierte Form, Glukose-6-Phosphat, haben eine zentrale Stellung im Metabolismus. Glukose ist unter physiologischen Bedingungen der wichtigste Energielieferant des Gehirns und das einzige metabolische Substrat, das die BHS in ausreichenden Mengen zur Aufrechterhaltung der Energieversorgung des Gehirns passieren kann. Deshalb sind Kontrollmechanismen, die das Nervensystem zur Regulation des Glukosestoffwechsels entwickelt hat, von besonderer Bedeutung.

Das Gehirn kann eine geringe, aber nicht unbedeutende Menge an Glukose in Form von Glykogen speichern (Gruetter, 2003). Neuere Studien weisen sogar darauf hin, dass der zerebrale Glykogengehalt bisher unterschätzt wurde (Cruz & Dienel, 2002; Kong et al., 2002). Glukose ist aber vermutlich nicht nur energetisches Substrat für Neurone, sondern wahrscheinlich auch an der Kontrolle spezifisch zentralnervös gesteuerter Prozesse, wie z.B. Lern- und Gedächtnisleistungen, beteiligt (Gold, 1995; Donohoe & Benton, 1999; McNay et al., 2000). Es ist seit vielen Jahren bekannt, dass Glukose neuronale Aktivität beeinflusst, und dass in verschiedenen Gehirnregionen spezielle Neurone existieren, die Glukose nicht allein als metabolisches Substrat nutzen, sondern für die Glukose vielmehr Signalwirkung zur Modulation ihrer Entladungsrate besitzt (Levin, 2002a,b). Vermutlich integrieren und interagieren diese glukorezeptiven Neurone mit einer Fülle metabolischer, neuronaler und hormoneller Signalstoffe, die an der Regulation von Energiehomöostase und Nahrungsaufnahme beteiligt sind (Levin et al., 2004; Song & Routh, 2005; Wang et al., 2004).

Die für den Zellstoffwechsel verfügbare Glukose spielt vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme. Ein starker Abfall des Blutglukosespiegels ist ein wirksamer Reiz, um die Nahrungsaufnahme auszulösen. Da die Hauptquelle für Glukose die Aufnahme von Nahrung ist, postulierte Mayer (1955) in seiner glukostatischen Hypothese, dass ein hypoglykämischer Blutzuckerstatus, d.h. der Punkt an dem die arterio-venöse Blutglukosedifferenz einen negativen Wert annimmt, als Signal für die Auslösung der Nahrungsaufnahme fungiert. Hypoglykämie kann experimentell ausgelöst werden. Die geläufigste Methode, die Nahrungsaufnahme bei sattten Ratten zu stimulieren, ist die periphere (Ritter et al., 1978) oder zentrale (Minami et al., 1995) Verabreichung von Glukoseantimetaboliten wie z.B. 2-Desoxy-D-Glukose (2DG). 2DG blockiert den intrazellulären Glukosemetabolismus durch Bindung an Glukosetransporter. Auch eine experimentell durch Insulin induzierte Hypoglykämie löst Nahrungsaufnahme aus (Cai et al., 2001). Glukosedeprievation stimuliert also unabhängig von ihrer Ursache die

Nahrungsaufnahme. Andererseits ist es umstritten, ob umgekehrt eine erhöhte Glukoseverfügbarkeit zur Beendigung der Nahrungsaufnahme führt (Gielkens et al., 1998; Melanson et al., 1999; Tordoff, et al., 1989). Durch experimentell induzierte Hypoglykämie können sympathisch, sympathoadrenal und neuroendokrin vermittelte gegenregulatorische Mechanismen zur Anhebung des Blutglukosespiegels aktiviert werden (Borg et al., 1999; Levin, 1991; Levin & Sullivan, 1987; Sanders & Ritter, 2000, 2001; Tkacs et al., 2000).

### Zusammenhang zwischen Schwankungen des Blutglukosespiegels und Initiierung der Nahrungsaufnahme

In den letzten Jahren war die mögliche Signalwirkung von Schwankungen des Blutglukosespiegels im Zusammenhang mit der Regulation der Nahrungsaufnahme immer wieder Gegenstand der experimentellen Forschung. Bereits 1980 zeigten Louis-Sylvestre und Le Magnen erstmals an Ratten, dass dem Beginn der Nahrungsaufnahme eine kurzfristige vorübergehende Abnahme des Blutglukosespiegels um 6 - 8% vorangeht und vermuteten hier einen kausalen Zusammenhang. Untersuchungen von Campfield et al. (1985, 1986) an Ratten zeigten, dass der Beginn der Nahrungsaufnahme eigentlich zeitgleich mit einem spontanen Anstieg des Blutglukosespiegels zusammenfällt, dem ein Abfall von ca. 10% vorausgeht. Derartige Schwankungen des Blutglukosespiegels kurz vor Initiierung der Nahrungsaufnahme treten unabhängig von Fütterungsstatus der Ratten auf. Der Unterschied besteht lediglich darin, dass der vor Beginn des Nahrungssucheverhaltens auftretende Abfall des Blutglukosespiegels bei futterdeprivierten Ratten eher beginnt und länger anhält als bei nicht-futterdeprivierten Ratten (Smith et al., 1993; Campfield & Smith, 2003). Auch bei Ratten, denen in Erwartung von Futter der Zugang zu diesem verwehrt bleibt, geht dieses „Signal“ dem Nahrungssucheverhalten voraus, unabhängig davon, ob das Futter hier visuell oder olfaktorisch für die Tiere wahrnehmbar ist oder nicht. Campfield und Smith schließen aus diesen Ergebnissen, dass die Prozesse, welche den vorübergehenden Abfall des Blutglukosespiegels im Zusammenhang mit der Initiierung der Nahrungsaufnahme generieren, unabhängig von Nahrungsaufnahmeverhalten und Fütterungsstatus der Ratten sind (Campfield & Smith, 1986, 2003).

Die von Campfield und Smith aufgrund ihrer Untersuchungsergebnisse formulierte „*Pattern detection and recognition*“-Theorie (2003) umfasst folgende Aspekte: (1.) Der vorübergehende Abfall des Blutglukosespiegels im Zusammenhang mit der Initiierung der Nahrungsaufnahme stellt ein endogenes metabolisches Verlaufsmuster dar. (2.) Dieses Verlaufsmuster repräsentiert ein Signal, das von Nahrungsaufnahmeverhalten regulierenden zentralnervösen Netzwerken registriert und (3.) mit den zentralen Regulationsvorgängen des

Nahrungsaufnahmeverhaltens verschaltet wird. Entscheidend ist nach diesem Konzept von Campfield und Smith, dass demnach nicht allein der Abfall des Blutglukosespiegels, die Glukoseverwertungsrate oder das Glukosemolekül an sich, sondern vielmehr die Erkennung eines charakteristischen Verlaufsmusters des Blutglukosespiegels den ausschlaggebenden Stimulus zur Initiierung der Nahrungsaufnahme darstellt.

### Zerebrale Glukose und Nahrungsaufnahme

Die Problematik der Mehrzahl der oben genannten Studien liegt darin, dass die experimentell peripher oder zentral erzielte Senkung oder Anhebung des Glukosespiegels stärker ist als die unter physiologischen Bedingungen von Luis-Sylvestre, Le Magnen und Campfield beobachteten Schwankungen des Blutglukosespiegels vor Beginn der Nahrungsaufnahme von 6-10%. Es fehlen Untersuchungen darüber, ob Manipulationen der Glukoseverfügbarkeit innerhalb dieser relativ schmalen physiologischen Konzentrationsschwankungen die Auslösung einer Mahlzeit bei Mensch und Tier überhaupt hervorrufen können. Obwohl durch die Beeinflussung des Glukosemetabolismus Nahrungsaufnahme initiiert wird und dabei zentrale Mechanismen eine Rolle spielen (Routh, 2002), ist nicht bekannt, ob sich unter physiologischen Bedingungen Glukosekonzentrationen vor der Nahrungsaufnahme auch im Gehirn ändern. Aufgrund dieser Problematik stellt sich zunächst die Frage, welche physiologischen Glukosekonzentrationen im Gehirn tatsächlich vorliegen. Unbekannt ist, ob das Gehirn über Mechanismen verfügt, um Änderungen des extrazellulären Glukosespiegels innerhalb eines so schmalen Bereiches, wie er peripher zur Auslösung der Nahrungsaufnahme relevant ist, zu registrieren und welche Mechanismen beteiligt sind.

### **2.3. *In vivo* Methoden zur Messung extrazellulärer zerebraler Glukose**

Es stehen verschiedene Methoden der *in vivo* Bestimmung zerebraler Glukose zur Verfügung. Dazu gehören die zerebrale Mikrodialyse und die Anwendung von Glukose-Biosensoren.

Die *in vivo* Mikrodialyse ermöglicht eine lokale Analyse der Extrazellulärflüssigkeit eines Organgewebes und erlaubt so einen Rückschluss auf die darin enthaltenen Substanzen. Dieses Verfahren hat sich in den letzten Jahren vor allem in den Neurowissenschaften aber auch in anderen Bereichen der Medizin zunehmend etabliert. Der Anwendungsbereich der Mikrodialyse umfasst sowohl Studien an tierischen als auch an menschlichen Organen und Geweben.

Das Grundprinzip der intrazerebralen Mikrodialyse beruht auf der Diffusion von Substanzen durch eine semipermeable Membran, welche die Grenze zwischen dem Extrazellularraum des ZNS und dem künstlichen Liquor im Inneren einer in das Zielgebiet implantierten Mikrodialysesonde bildet. Entsprechend des Konzentrationsgefälles und der Durchlässigkeit der Sondenmembran können sich die Substanzen nach dem Diffusionsgesetz verteilen. Ein permanenter Fluss des künstlichen Liquors sorgt im Inneren der Mikrodialysesonde für ein gleich bleibendes und hohes Konzentrationsgefälle.

Das Prinzip der Diffusion durch eine semipermeable Membran wurde erstmals 1966 angewandt. Hierfür wurden „Dialyse-Säckchen“ in die Gehirn-Hemisphären von Hunden implantiert (Bito et al., 1966). Delgado et al. entwickelten 1972 die erste „Dialytrode“, bei der zwei feine *push-pull* Kanülen in einem permeablen Säckchen endeten. Die heute gebräuchliche Technik der intrazerebralen Mikrodialyse geht vor allem auf Entwicklungen von Ungerstedt et al. (1982) zurück. Die bevorzugte Ausführung einer Mikrodialysesonde besteht aus zwei ineinander angeordneten Kanülen mit einer Spitze aus Dialyseschlauch. Der Vorteil dieses Modells ist der geringe Durchmesser der Sonde. Mit dieser Mikrodialysetechnik ist es möglich, gewebeschonend Konzentrationsveränderungen von physiologischen und pharmakologischen Substanzen in der Extrazellulärflüssigkeit eines bestimmten Gehirnareals von sich frei bewegenden Tieren über eine längere Dauer zu bestimmen und zeitgleich eine Analyse des Verhaltens durchzuführen. Die ursprünglich für den experimentellen Gebrauch entwickelte Mikrodialysetechnik wurde in den letzten Jahren immer mehr in verschiedene Gebiete der klinischen Gehirnforschung und in die Intensivmedizin integriert. Sie findet aber nicht mehr nur in der Gehirnforschung, sondern auch bei Untersuchungen des Metabolismus im Fettgewebe, im Skelettmuskel, im Blut und in anderen Organen wie beispielsweise Leber und Herz Verwendung.

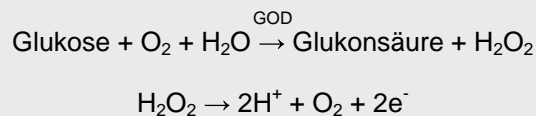
### *Vorteile der Mikrodialyse:*

Die kontinuierliche Sammlung von Dialysat aus einem oder mehreren Hirnarealen ermöglicht Untersuchungen über einen längeren Zeitraum. Durch die empfindliche Analysetechnik kann die zeitgleiche Bestimmung eines breiten Spektrums von Neurotransmittern und Metaboliten erfolgen. Die Mikrodialyse kann am wachen und frei beweglichen Tier durchgeführt werden, schließt so Narkosenebenwirkungen aus und ermöglicht Untersuchungen unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen. Darüber hinaus können durch die Mikrodialysesonde membrangängige Pharmaka ohne zusätzliche Belastungen für das Tier in die zu untersuchenden Gehirngebiete gebracht werden.

*Nachteile der Mikrodialyse:*

Es entstehen Schäden durch Gewebsverletzungen in der Umgebung der Mikrodialysesonde. Durch die kontinuierliche Diffusion von Transmittern, Metaboliten oder Vorstufen in die Sonde kommt es zu einer Auswaschung des Extrazellulärraumes. Aufgrund der entgasten und sauerstoffarmen Dialyseflüssigkeit kann eine lokale Hypoxie um die Dialysesonde entstehen.

Glukose-Biosensoren sind implantierbare enzymbeschichtete Elektroden, mit deren Hilfe Glukose amperometrisch gemessen werden kann. Das Prinzip von elektro-enzymatischen Methoden besteht in der Messung der Konzentration von Verbindungen auf der Grundlage ihrer Redoxeigenschaften. Glukoseelektroden nutzen Glukoseoxidase (GOD) zur Bestimmung von Glukose. Bei der Oxidation von Glukose entsteht Wasserstoffperoxid. Das freigesetzte Wasserstoffperoxid oxidiert an der Elektrode und erzeugt Strom, der proportional zur Glukosekonzentration der Probe ist.



Diese Methode ermöglicht die Messung von Änderungen der extrazellulären Glukosekonzentration bestimmter Gehirnregionen im Zusammenhang mit Änderungen des Blutglukosespiegels (Silver & Erecinska, 1994, 1998).

Die Vorteile der Glukose-Biosensoren liegen in der geringen Schädigung des umliegenden Gewebes durch die im Vergleich zur Mikrodialysesonde geringen Elektrodengröße, die Schnelligkeit der Messvorgänge und das Fehlen von Auswascheffekten, da dem Gewebe keine Moleküle entzogen werden. Von Nachteil ist das Risiko, die gemessenen Glukosekonzentrationen zu überschätzen, da GOD auch Ascorbat und Harnsäure oxidiert sowie die kurze Lebensdauer der Elektroden. Nachteilig ist ebenfalls, dass nicht mehrere Substanzen gleichzeitig bestimmt werden können, wie es bei der Mikrodialyse möglich ist.

## 2.4. Physiologische Glukosekonzentrationen

Da nicht bekannt ist, ob unter physiologischen Bedingungen Änderungen im Konzentrationsverlauf zerebraler Glukose im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme auftreten, muss zunächst die Frage geklärt werden, welche physiologischen Konzentrationen extrazellulärer Glukose im Gehirn vorherrschen.

Bei der Ratte werden Blutglukose-Basalwerte von 5,0 bis 8,0 mM (80 bis 120 mg/dl) angegeben (Dawson et al., 1971; de Boer et al., 1990; de Vries et al., 2003; Gärtner et al., 1980; Levin 2002b; Routh 2002; Silver & Erecinska, 1998). Van Zutphen (1995) nennt Werte von 7,4 bis 12,2 mM und betont, dass Blutglukosekonzentrationen unter Stressbedingungen auf das Zweifache der Normwerte ansteigen können. Die absoluten Glukosekonzentrationen im Gehirn unter physiologischen Bedingungen werden nach wie vor kontrovers diskutiert. Verschiedene Untersuchungen zeigen jedoch, dass die extrazellulären Glukosespiegel in den meisten Gehirnregionen im Vergleich zu den Blutglukosekonzentrationen deutlich niedriger sind. Es wird vermutet, dass unter physiologischen Bedingungen die Glukoseversorgung des Gehirns durch das Blut über den metabolischen Bedarf hinaus geht (Baker et al., 1997; Partridge, 1994; Robinson & Rapoport, 1986). Außerdem scheint neuronale Aktivität die lokalen extrazellulären Glukosekonzentrationen zu beeinflussen. Die Injektion des Na<sup>+</sup>-Kanal-Blockers Tetrodotoxin in das Gehirn von Ratten führt über eine verminderte neuronale Aktivität zu signifikant erhöhten extrazellulären Glukosekonzentrationen (Fellows et al., 1992). Die Induzierung neuronaler Aktivität durch intrazerebrale Verabreichung von Veratridin führt über die Aktivierung spannungsabhängiger Na<sup>+</sup>-Kanäle und Stimulierung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase zu einem deutlichen Abfall der extrazellulären Glukosekonzentrationen (Fellows et al., 1992; Fray et al., 1997).

In der Literatur variieren die Angaben über Glukosekonzentrationen im Gehirn der Ratte im Bereich normoglykämischer Blutglukosekonzentrationen von 0,35 bis 3,3 mM. Da einige dieser Untersuchungen zur Bestimmung zerebraler Glukosekonzentrationen an narkotisierten Ratten (Hu & Wilson, 1997; Ronne-Engstrom et al., 1995; Silver & Erecinska, 1994) vorgenommen wurden und bekannt ist, dass eine Narkose die zerebralen Glukosekonzentrationen beeinflussen kann (Fellows et al., 1992; Lonjon et al., 2001), werden nachfolgend nur Ergebnisse von Untersuchungen an wachen Tieren aufgeführt (Tab. 1).

Die Spanne der ermittelten zerebralen Glukosekonzentrationen beruht vermutlich einerseits auf den verschiedenen zur Anwendung kommenden Messmethoden, andererseits wurde

gezeigt, dass zerebrale Glukosekonzentrationen auch von dem Rattenstamm, der Gehirnregion (McNay & Gold; 1999) und dem Fütterungsstatus (de Vries et al., 2003; Voigt et al., 2004) abhängig sind. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass die Glukosekonzentrationen im Gehirn absinken, wenn die Ratten bestimmte Verhaltenstests absolvieren (McNay et al., 2000) und dieser Abfall wiederum regional unterschiedlich und auch altersabhängig ist (McNay et al., 2001; McNay & Gold, 2001).

Extrazelluläre Glukosekonzentrationen im Gehirn der Ratte				
[mM]	Gehirnregion	Rattenstamm	Messmethode	Referenz
0,45	Striatum	Sprague-Dawley	Mikrodialyse	Fellows et al. (1992)
0,35	Striatum	Sprague-Dawley	Mikrodialyse	Fray et al. (1997)
0,35	Striatum	Sprague-Dawley	Glukose-Biosensoren	Lowry et al. (1998)
0,71	Striatum	Sprague-Dawley	Mikrodialyse	McNay & Gold (2001)
1,0	Hippocampus	Sprague-Dawley	Mikrodialyse	McNay & Gold (1999)
1,24	Hippocampus	Fischer-344	Mikrodialyse	McNay & Gold (1999)
1,4	VMH	Sprague-Dawley	Mikrodialyse	de Vries et al. (2003)
0,7	VMH	Sprague-Dawley, futterdepriviert	Mikrodialyse	de Vries et al. (2003)
1,3	LH	Wistar	Mikrodialyse	Voigt et al. (2004)
0,85	LH	Wistar, futterdepriviert	Mikrodialyse	Voigt et al. (2004)

**Tabelle 1:** Extrazelluläre Glukosekonzentrationen im Gehirn der Ratte. Angaben über Gehirnregion, Rattenstamm und Messmethode.

## 2.5. Glukorezeptive Neurone

Um regulierend auf den Glukosestoffwechsel zu wirken, muss das Gehirn Informationen über die Glukoseverfügbarkeit innerhalb des Organismus erhalten, integrieren und verarbeiten. Dafür müssen im Gehirn Mechanismen vorhanden sein, die diese Informationen aufnehmen. In der Leber existieren Sensoren, welche die Nährstoffverfügbarkeit (Glukose und Fettsäuren) außerhalb der BHS überwachen und die Informationen über den Vagusnerv an das Gehirn senden (Ritter & Taylor, 1990; Lutz et al., 1997). Da das Gehirn zur Deckung seines eigenen Energiebedarfs überwiegend Glukose nutzt, sind die dort befindlichen Sensoren sensibel für Glukosedepriivation.

1964 beschrieben Anand et al. und Oomura et al. unabhängig voneinander Neurone im Hypothalamus, die auf Änderungen der Blutglukosekonzentration mit einer Änderung der Frequenz ihres Aktionspotentials reagieren. Während „*glucose excited*“ Neurone (GE) ihre Entladungsrate bei steigenden extrazellulären Glukosekonzentrationen erhöhen, senken „*glucose inhibited*“ Neurone (GI) ihre Entladungsrate unter denselben Bedingungen. GE und GI Neurone finden sich u. a. im LH, VMH und auch im Nucleus tractus solitarius (NTS) des Hirnstammes (Levin, 2002a, b; Routh, 2002), wobei GE Neurone vor allem im VMH und GI Neurone überwiegend im LH vorhanden sind (Oomura et al., 1969; Routh, 2002). In Abhängigkeit von der Gehirnregion sind diese Neurone quantitativen und temporären Schwankungen des zerebralen Glukosespiegels ausgesetzt (Levin et al., 2004). Aufgrund der im Bereich des ARC und des NTS fehlenden BHS können beide Hirnregionen durch peripher zirkulierende Substanzen erreicht werden. So erhalten glukorezeptive Neurone dieser Regionen aufgrund ihrer Lage gleichzeitig Informationen über Blutglukosekonzentrationen und über zerebrale Glukosekonzentrationen. Das erklärt vermutlich, weshalb Neurone des ARC und NTS nur auf starke Schwankungen des Glukosespiegels im Bereich von 0,5 bis 10,0 mM reagieren. Neurone des VMH dagegen, die nur zerebralen Glukoseschwankungen ausgesetzt sind, modulieren ihre Entladungsrate innerhalb eines viel engeren Konzentrationsbereiches (0,1 bis 2,5 mM) (Dunn-Meynell et al., 2002; Kang et al., 2004; Levin et al., 2004; Song et al., 2001). Glukorezeptive Neurone liegen in Gehirnregionen, die an der Kontrolle neuroendokriner Funktionen und an der Regulation von Nahrungsaufnahme und Energiehomöostase beteiligt sind. Inzwischen ist bekannt, dass viele dieser Neurone nicht nur durch Glukose, sondern auch durch eine Vielzahl anderer Signale moduliert werden, unter anderem durch Insulin, Leptin und Laktat (Song & Routh, 2005; Spanswick et al., 1997, 2000; Wang et al., 2004).

Obwohl noch unbekannt ist, ob im Gehirn unter physiologischen Bedingungen Schwankungen des Glukosespiegels diesen Ausmaßes auftreten, ist jedoch bekannt, dass ein starker Abfall von Glukose Nahrungsaufnahme stimuliert und zur Auslösung gegenregulatorischer Mechanismen führt, um eine ausreichende Glukoseverfügbarkeit zur Aufrechterhaltung zerebraler Funktionen zu gewährleisten (Levin et al., 2004). Es wird angenommen, dass GE Neurone des VMH an Gegenregulationsmechanismen infolge einer hypoglykämischen Stoffwechsellage beteiligt sind, während GI Neuronen des VMH eine Beteiligung an der Kontrolle von Schwankungen extrazellulärer Glukosespiegel im normoglykämischen Bereich und damit an der Einleitung und Beendigung des Nahrungsaufnahmeverhaltens beigemessen wird (Routh, 2002). Es ist bekannt, dass glukorezeptive Neurone orexigene und anorexigene Faktoren freisetzen. Hypoglykämie hat im LH die Aktivierung von Orexin-Neuronen zufolge und bewirkt einen Anstieg des Orexin-B-



Gehalts (Cai et al., 2001). GI-Neurone des ARC enthalten NPY und GE-Neurone POMC, das Vorläuferprotein des anorexigenen Faktors  $\alpha$ -MSH (Ibrahim et al., 2003; Muroya et al., 1999).

*In vivo* - Untersuchungen an Ratten von Ritter et al. (2000) zeigten, dass im Bereich des Hirnstammes glukorezeptive Strukturen existieren, die vermutlich bei der Kontrolle von Nahrungsaufnahme und des Blutglukosespiegels eine Rolle spielen. In diesen Experimenten wurde der Glukoseantimetabolit 5-Thio-D-Glukose (5-TG) eingesetzt, um Nahrungsaufnahme zu stimulieren. Die meisten der auf die Applikation von 5-TG ansprechenden Hirnstrukturen wurden im Bereich des Hirnstammes lokalisiert. Im Gegensatz dazu wurden erstaunlicherweise nur wenige Gebiete im Hypothalamus gefunden, bei denen nach Injektion von 5-TG Nahrungsaufnahme beobachtet werden konnte. Ritter et al. gehen aufgrund ihrer Ergebnisse davon aus, dass die hypothalamischen Kerngebiete möglicherweise eher an Prozessen mitwirken, welche die Motivation zur Nahrungsaufnahme steuern und weniger an der direkten Stimulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind. Im Gegensatz dazu vermuten Levin et al. (2000) im Hypothalamus zwei überlappende und interagierende glukorezeptive Systeme, die an der Regulation des Nahrungsaufnahmeverhaltens beteiligt sind: Eines, das die Motivation zur Nahrungsaufnahme steuert und ein zweites, das die metabolischen Prozesse reguliert.

## **2.6 Glukosetransport im Gehirn**

### Glukosetransporter der GLUT-Familie

Um die neuronale Aktivität glukorezeptiver Strukturen im Gehirn zu beeinflussen, muss Glukose zunächst die BHS überwinden. Der zerebrale Transport von Glukose wird durch membranständige Glukosetransporterisoformen der GLUT-Familie (Mueckler, 1994) vermittelt. Die Aufnahme von Glukose über diese Carrierproteine erfolgt „passiv“ durch erleichterte Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten. Damit das notwendige Konzentrationsgefälle aufrecht erhalten wird, reagiert Glukose zu Glukose-6-Phosphat. Dieser Vorgang wird durch Hexokinase katalysiert. Bisher sind 14 Isoformen der GLUT-Familie des menschlichen Genoms bekannt (Scheepers et al., 2004). Diese werden in Abhängigkeit von ihrer Gensequenz und ihrer charakteristischen Eigenschaften in drei Klassen unterteilt (Joost & Thorens, 2001). Am besten charakterisiert sind die Isoformen der Klasse I, GLUT1 bis GLUT4 und GLUT14, die sich anhand ihrer bevorzugten Gewebeverteilung voneinander abgrenzen. Zur Klasse II gehören der Fruktose-Transporter GLUT5 und die diesem strukturell verwandten Transporter GLUT7, GLUT9 und GLUT11.

Der Klasse III gehören die „neuen“ Transporter GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 und der H<sup>+</sup>/myo-inositol-Cotransporter (HMIT) an, welche sich strukturell von denen der Klassen I und II unterscheiden. Die spezifischen Eigenschaften der verschiedenen Glukosetransporterisoformen sind für das Verständnis der Mechanismen zerebraler Glukoseverwertung von großer Bedeutung.

#### Lokalisation, Ausbreitung und Kinetik der Glukosetransporter im Gehirn

Die Glukosetransporterisoformen *GLUT1* und *GLUT3* sind die im Gehirn am zahlreichsten exprimierten Isoformen der GLUT-Familie und sind dort vermutlich trotz unterschiedlicher Lokalisation in annähernd gleicher Konzentration vorhanden (Maher et al., 1994; Vannucci et al., 1997). Andere Isoformen der GLUT-Familie werden im Gehirn in wesentlich geringerer Dichte exprimiert und sind auf einzelne Gehirnareale begrenzt (Bell et al., 1993; Maher et al., 1994; McEwen & Reagen, 2004; Vannucci et al., 1997, 1998a,b).

Der *GLUT1-Transporter* ist im Gehirn (Brant et al., 1993; Rayner et al., 1994) wie in der Peripherie (Mueckler et al., 1985), ubiquitär verbreitet und reguliert die Grundversorgung der Zellen mit Glukose. GLUT1 hat eine besondere Bedeutung für die Glukoseversorgung der Zellen des ZNS. Er wird in den Endothelzellen der BHS (luminal/abluminal) und in perivaskulären Astrozyten sehr stark exprimiert (Gerhart et al., 1989; Leino et al., 1997; McCall et al., 1996; Morgello et al., 1995) und vermittelt den Glukosetransport aus dem Blut über die BHS ins Gehirn (Pardridge et al., 1990). Aufgrund seiner niedrigen Michaelis-Konstante für Glukose ( $K_m = 6-8$  mM, Vannucci et al., 1997) ermöglicht GLUT1 die Aufrechterhaltung einer ausgewogenen Glukoseversorgung sowohl unter normoglykämischen als auch unter hypoglykämischen Bedingungen (Gould, 1997). Pathophysiologische Zustände wie Glukosedepriivation, Hypoxie und Ischämie führen zu einer gesteigerten zerebralen GLUT1-Genexpression (Boado & Pardridge, 1993, 2002; Lee & Bondy, 1993; McCall et al., 1996).

*GLUT3* ist der wichtigste neuronale Glukosetransporter und kommt außer in den Neuronen des Gehirns auch in anderen Geweben mit hohem Glukosebedarf, wie z.B. in Hoden und Placenta, vor (Boileau et al., 1995; Burant & Davidson, 1994; Maher et al., 1992). GLUT3 hat mit einem  $K_m$ -Wert von etwa 2-3 mM eine hohe Glukoseaffinität. Im Unterschied zu GLUT1 weist GLUT3 eine jedoch höhere Umsatzrate auf und kann so Glukose 7x schneller als GLUT1 transportieren (Maher et al., 1996). Durch seine hohe Affinität zu Glukose transportiert GLUT3 ebenso wie GLUT1 Glukose mit einer konstanten Geschwindigkeit und

versorgt zerebrale Neurone selbst bei niedrigen extrazellulär herrschenden Glukosekonzentrationen effizient.

GLUT2 wurde im Gehirn, beschränkt auf einzelne Astrozytenpopulationen, unter anderem im NTS, PVN, LH, VMH und ARC gefunden (Leloup et al., 1994; Roncero et al., 2004). Dazu gehören Astrozytenpopulationen, deren Fortsätze einen Teil der BHS bilden. Sie nehmen Glukose auf und können diese in Form von Glykogen speichern (Wiesinger et al., 1997; Leloup et al., 1994; Vannucci et al., 1997). Peripher wird GLUT2 vor allem in den Hepatozyten, in den  $\beta$ -Zellen der Pankreasinseln, in der Niere und im Dünndarm exprimiert (Thorens et al., 1990). Auffallend ist der hohe  $K_m$ -Wert für Glukose (15 – 20 mM). GLUT2 stellt damit unter den Glukosetransportern der GLUT-Familie die Isoform mit der niedrigsten Affinität zu Glukose dar. Durch seine niedrige Glukoseaffinität ist dieser Transporter auch bei erhöhten Glukosekonzentrationen nicht voll gesättigt. In Leber und Pankreas bildet GLUT2 zusammen mit *Glukokinase* (Hexokinase IV, GK) vermutlich ein glukorezeptives System, das schon auf geringe Änderungen der Blutglukosekonzentration mit entsprechenden Änderungen von Glukoseaufnahme und Insulinfreisetzung reagiert (Matschinsky, 1990). GLUT2 ist in Verbindung mit GK vermutlich auch innerhalb des Gehirns an glukorezeptiven Vorgängen beteiligt (Dunn-Meynell et al., 2002; Kang et al., 2004; Yang et al., 2004; Wang et al., 2004).

GLUT4 ( $K_m = 5$  mM) ist der wichtigste insulinabhängige Glukosetransporter und reguliert die schnelle Glukoseaufnahme in der Skelettmuskulatur, den Herzmuskel sowie in die Adipozyten und die Placentazellen. Die Besonderheit dieser Isoform besteht in der insulinabhängigen, innerhalb von Minuten ablaufenden (Patki et al., 2001) Rekrutierung des Transporters aus intrazellulär vorliegenden Pools und dessen Translokation in die Plasmamembran, wodurch eine schnelle Reaktion der Zellen auf veränderte metabolische Erfordernisse, wie bei der Muskelkontraktion, möglich wird (Rodnik et al., 1992; Ryder et al., 2001; Tsao et al., 2001). Im Gehirn wird dieser Transporter überwiegend im Zerebellum exprimiert (Vannucci et al., 1997, 1998/b). Im VMH wurde GLUT4 neben GLUT1 innerhalb der BHS entdeckt (McCall et al., 1997; Ngarmukos et al., 2001). Die physiologische Rolle der GLUT4 Expression im Gehirn ist noch weitgehend unbekannt, findet aber vor allem in Regionen statt, in denen sowohl Insulin (Devaskar et al., 1994) als auch Insulinrezeptoren exprimiert werden (Hill et al., 1986; Lesniak et al., 1988). Die Lokalisation innerhalb der BHS des VMH lässt eine Beteiligung an glukorezeptiven Vorgängen vermuten (Alquier et al., 2001; Ngarmukos et al., 2001).

Die mRNA des Fruktose-Transporters GLUT5 wird in erster Linie in Dünndarm, Niere und Hoden exprimiert (Kayano et al., 1990). GLUT5 weist keine Glukosetransportaktivität auf. Durch immunohistochemische Analysen wurde GLUT5 in Mikrogliazellen, den im Gehirn ansässigen Makrophagen, nachgewiesen (Maher et al., 1994; Payne et al., 1997) und vermittelt vermutlich den Transport bisher nicht identifizierter Substrate (Magistretti, 2003).

GLUT6 wird überwiegend im Gehirn exprimiert (Doege et al., 2000a). Die exprimierenden Zellen im Gehirn sind noch nicht klar identifiziert. Dwyer et al. (2002) vermuten eine neuronale Lokalisation. In der Peripherie wird GLUT6 überwiegend in der Milz und den Lymphozyten exprimiert (Doege et al., 2000a). GLUT6 hat vermutlich eine geringe Affinität zu Glukose, da eine Transportaktivität nur bei höheren Glukosekonzentrationen (5mM) nachgewiesen werden konnte. Es ist möglich, dass GLUT6 auch andere, noch nicht bekannte Substrate mit einer größeren Affinität transportiert (Doege et al., 2000a).

GLUT8 ist der mit GLUT6 strukturell am engsten verwandte Transporter (Joost & Thorens, 2001) und weist eine hohe Affinität zu Glukose auf ( $K_m = 2 \text{ mM}$ ) (Doege et al., 2001; Ibberson et al., 2000). GLUT8-mRNA wurde im Gehirn im Hypothalamus, im Zerebellum, im Hirnstamm und im Hippocampus überwiegend innerhalb von neuronalen Zellkörpern nachgewiesen (Ibberson et al., 2000; Reagen et al., 2002). Es wird angenommen, dass die Expression dieses Transporters an der Zelloberfläche hormonell oder durch andere Stimuli reguliert wird (Ibberson et al., 2000; Doege et al., 2000b). Eine insulininduzierte Translokation dieses Transporters wurde nachgewiesen (Carayannopoulos et al., 2000). Die Bedeutung dieses Transporters als neuronaler Glukoselieferant ist noch nicht vollständig geklärt.

## 2.7. Laktat und Nahrungsaufnahme

In den meisten Geweben wird Laktat hauptsächlich unter anaeroben Stoffwechselbedingungen aus Pyruvat gebildet, um die Glykolyse aufrecht zu erhalten. Anschließend wird es sauerstoffabhängig im Krebszyklus durch Oxidation oder durch Glukoneogenese im Cori-Zyklus metabolisiert. Die wesentlichen Organe der Laktatbildung sind der arbeitende Muskel, die Erythrozyten, das Gehirn und das Nebennierenmark.

Für zerebrale extrazelluläre Laktatkonzentrationen bei Ratten werden in der Literatur Konzentrationen von 0,3 bis 1,3 mM angegeben. Anhand von Mikrodialysestudien wurden im Striatum von Ratten Konzentrationen von etwa 0,3 bis 1,1 mM ermittelt (Demestre et al., 1997; Kuhr & Korf, 1988; Rhemrev-Boom, 2003). NMR-Spektroskopie-Untersuchungen am Menschen fanden im visuellen Cortex Konzentrationen von etwa 0,7 mM (Prichard et al., 1991). Messungen mittels Biosensoren ergaben im Cortex von Ratten in der Ruhe- bzw. Lichtphase etwa 0,4 mM und in der Aktivitäts- bzw. Dunkelphase etwa 1,26 mM (Shram et al., 2002).

In der Humanmedizin dient Laktat als zerebraler Ischämie marker, da die Laktatwerte während einer Ischämie oder Hypoxie als unmittelbarer Ausdruck einer in Gang gesetzten anaeroben Glykolyse ansteigen (Busse, 1982; de Haan et al., 1994; Duffy et al., 1982; MacMillan & Siesjö, 1972). Darüber hinaus wird Laktat im Liquor differentialdiagnostisch zur Abgrenzung von bakteriellen und viralen Meningitiden, zur Unterscheidung zerebraler Blutungen von artifiziellen Blutbeimengungen sowie zur Differenzierung transitorischer ischämischer Attacken von generalisierten Krampfanfällen untersucht.

### Zerebrales Laktat als neuronale Energiequelle

Laktat galt lange nur als Endprodukt der anaeroben Glykolyse ohne weitere Stoffwechselfunktion. Die herkömmliche Annahme, Glukose sei unter physiologischen Bedingungen das einzige metabolische Substrat, welches das Gehirn zur Aufrechterhaltung der neuronalen Aktivität nutzt (Siesjö, 1979; Sokoloff, 1981), wird immer öfter in Frage gestellt. *In vitro* Studien zeigen, dass auch Laktat eine effiziente Energiequelle für Neurone darstellt und zur Aufrechterhaltung der synaptischen Übertragung, insbesondere in Phasen erhöhter synaptischer Aktivität, sogar Glukose vorgezogen wird (Schur et al., 1988, 1999). Neuere *in vitro* und erste *in vivo* Untersuchungen weisen auch darauf hin, dass Laktat im Frühstadium nach hypoxisch-ischämischen Zuständen eine wichtige aerobe Energiequelle zur Wiederherstellung synaptischer Übertragungsfähigkeit von Neuronen darstellt (Schurr et

al., 1997a,b, 2001). Weiterhin ist bekannt, dass eine experimentell durch Insulin induzierte Hypoglykämie die zerebrale Metabolisierung von Laktat erhöht (Hellmann et al., 1982) und Laktatinfusionen in den VMH von Ratten gegenregulatorische Mechanismen als Reaktion auf eine hypoglykämische Stoffwechsellage unterdrücken (Borg et al., 2003).

Wahrscheinlich wird extrazelluläres Laktat im Gehirn überwiegend von Astrozyten synthetisiert (Hu & Wilson 1997; Korf, 1996; Pellerin et al., 1998; Schurr et al., 1999). Nach Pardridge & Oldendorf (1977) kann peripher produziertes Laktat *in vivo* keine bedeutende zerebrale Energiequelle darstellen, da es die BHS nur unzureichend überwinden kann. Heute wird jedoch davon ausgegangen, dass ein geringer Teil des extrazellulären Laktats aus dem Blut stammt (Hassel & Brathe, 2000). Auch eine *in vivo* Studie von Smith et al. (2003) bekräftigt die Hypothese, dass das menschliche Gehirn auch bei normalen Glukosekonzentrationen zirkulierendes Laktat zumindest zum Teil zur Unterstützung des Stoffwechsels nutzt. Tatsächlich existieren im Gehirn spezielle Transporter, die Monocarboxylat-Transportproteine (MCT), die Laktat den Übertritt durch die BHS und die Aufnahme in Axone und Neurone ermöglichen (Dringen et al., 1995; Price et al., 1998; Tildon et al., 1993). Die Permeabilität für Laktat beträgt dabei etwa 25-50% der Permeabilität von Glukose (Cremer et al., 1979; Knudsen et al., 1991). MCT1 wird vor allem in Astrozyten und MCT2 in Neuronen exprimiert (Broer, et al., 1997).

Es wird vermutet, dass Neurone von Gliazellen freigesetztes Laktat gegenüber Glukose als Energiequelle zur Aufrechterhaltung der synaptischen Übertragungsfähigkeit bevorzugen, insbesondere in Phasen erhöhter neuronaler Aktivität (Pellerin et al., 1998; Pellerin & Magistretti, 1994, 1997, 2003). Nach dieser so genannten „*astrocyte-neurone-lactat-shuttle*“-Hypothese (Pellerin et al., 1998) erhöht neuronale Aktivität die extrazelluläre Konzentration des exzitatorischen Neurontransmitters Glutamat. Die Aufnahme von Glutamat in Astrozyten führt über die Stimulation der Glykolyse zu einem erhöhten Glukoseverbrauch und damit zu einer Anreicherung von Laktat. Das über MCT1 aus den Astrozyten freigesetzte Laktat wird zu Neuronen transferiert, über MCT2 aufgenommen und als aerobes Energiesubstrat zu Pyruvat metabolisiert, welches in den Citratzyklus zur oxidativen Energiegewinnung eingeschleust wird und den Großteil der ATP-Gewinnung ausmacht (Chih et al., 2001). Im Gegensatz zu anderen Geweben, in denen Laktat hauptsächlich unter anaeroben Bedingungen angereichert wird, findet die Bildung von Laktat in Gliazellen auch in Gegenwart von Sauerstoff und bei ausreichender Glukoseversorgung statt (Magistretti & Pellerin, 1997). Rückhalt erhält diese Hypothese durch *in vivo* Untersuchungen. Diese zeigen, dass im menschlichen Gehirn Laktat auch bei physiologischen Glukosekonzentrationen bevorzugt genutzt werden kann und dass Erhöhungen der

Blutlaktatkonzentrationen auf Werte, die denen bei starker körperlicher Anstrengung entsprechen, zu einer signifikanten Reduktion der zerebralen Glukoseverwertung führen (Smith et al., 2003). Aufgrund von Messungen der arterio-venösen Differenzen von Laktat wird angenommen, dass das bei erhöhten körperlichen Anstrengungen im Skelettmuskel gebildete Laktat dem Gehirn als oxidatives Substrat dienen kann (Ide et al., 2000).

### Laktat und Nahrungsaufnahme

Ein weiterer Hinweis darauf, dass Laktat mit großer Wahrscheinlichkeit eine wesentlich größere Bedeutung für die zerebrale Energieversorgung hat, ist die Wirkung von Laktat auf glukorezeptive Neurone. Wie schon erwähnt, existieren im Gehirn Neurone, welche die Frequenz ihrer Entladungsrate auf sich ändernde extrazelluläre Glukosekonzentrationen abstimmen (Levin, 2002a,b; Song et al., 2001). Song und Routh (2005) postulieren, dass Glukose vermutlich nicht die einzige zerebrale Energiequelle ist, welche einen regulierenden Einfluss auf die Entladungsrate dieser Neurone hat. Sie untersuchten *in vitro* die Effekte von Laktat auf GE und GI Neurone im VMH im Vergleich zu Glukose und fanden, dass Glukose und Laktat ähnliche Effekte auf GE Neurone, aber eine entgegengesetzte Wirkung auf GI Neurone ausüben. Neurone ohne glukorezeptive Eigenschaften zeigten auch gegenüber Laktat keine Frequenzänderung ihres Aktionspotentials (Song & Routh, 2005). Es wird angenommen, dass diese glukorezeptiven Neurone mit einer Fülle metabolischer, neuronaler und hormoneller Signalstoffe interagieren, die an der Regulation von Energiehomöostase und Nahrungsaufnahme beteiligt sind (Levin et al., 2004; Wang et al., 2004). Während viele Studien vorliegen, die sich mit dem zerebralen Laktatstoffwechsel befassen, gibt es so gut wie keine Untersuchungen im Kontext mit Nahrungsaufnahme. Goucham & Nicolaidis (1999) untersuchten in einer Mikrodialyestudie an futterdeprivierten Ratten zerebrale extrazelluläre Laktatspiegel im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme. Sie fanden im VMH und PVN des Hypothalamus, also in zerebralen Gebieten, die vermutlich eine herausragende Rolle bei der Kontrolle von Hunger und Sättigung spielen, einen eindeutigen Anstieg der extrazellulären Laktatkonzentrationen während der Nahrungsaufnahme. Im Gegensatz dazu zeigten sich im Zerebellum, einer Gehirnregion, die nicht in die Regulation der Nahrungsaufnahme involviert ist, keine Veränderungen im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme.