

Aus der Radiologischen Klinik und Poliklinik
des Klinikum Benjamin Franklin
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Karl-Jürgen Wolf
Abteilung: Radiologie und Nuklearmedizin

**Quantifizierung von Schilddrüsenhormonen in subzellulären Fraktionen
verschiedener Areale des Rattenhirns: Effekte von antidepressiven Pharmaka,
von Stress sowie von Hypo- und Hyperthyreosen.**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades Doctor rerum medicarum
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von: Oliver Brödel
aus: Gütersloh

Referent: Prof. Dr. med. A. Baumgartner

Korreferent: Prof. Dr. H. Rommelspacher

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 13.12.2002

Zusammenfassung

Schilddrüsenhormone wirken an spezifischen subzellulären Strukturen, wurden jedoch bisher nur in Gesamthomogenaten von Hirnarealen der Ratte gemessen. Aus diesem Grund wird in der hier vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt, die Homogenate von elf Rattenhirnarealen durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation in fünf subzelluläre Fraktionen aufzutrennen: in Nuklei, Mitochondrien, Myelin, Synaptosomen und Mikrosomen. Die Reinheit der jeweiligen Fraktionen wurde durch Quantifizierung von biochemischen „Markern“ sowie elektronenmikroskopisch überprüft. Die Schilddrüsenhormone T3 und T4 wurden in den subzellulären Fraktionen mit Hilfe von sensitiven Radioimmunoassays quantifiziert.

Verschiedene pharmakologische und nichtpharmakologische Behandlungsformen zeigten die folgenden Ergebnisse: a) Vier chemisch unterschiedliche Antidepressiva induzierten eine signifikante Zunahme der T3-Konzentrationen in der Myelinfraktion der Amygdala. Die Phasenprophylaktika Lithium und Carbamazepin sowie ein achtstündiger Schlafentzug führten zu einer Zunahme der T3-Konzentrationen in den Synaptosomen der Amygdala. Antidepressiva induzierten ebenfalls eine Zunahme der mitochondrialen Proteinkonzentrationen und der Aktivität des mitochondrialen Enzyms Succinatehydrogenase in der Amygdala. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Psychopharmaka über ihre Effekte auf die Schilddrüsenhormonkonzentrationen ganz spezifische Funktionen der Amygdala beeinflussen und dass diese Effekte höchstwahrscheinlich am bisher unbekanntem Wirkungsmechanismus der Medikamente beteiligt ist. b) Verschiedene Formen von Stress, wie z. B. akute oder über einen Zeitraum von 14 Tagen durchgeführte i.p.-Injektionen mit Kochsalz, führten zu spezifischen Veränderungen der T3-Konzentrationen verschiedener Subfraktionen; c) die Induktion einer Hyperthyreose mit T3 bzw. mit T4 induzierte eine Zunahme der T3-Gewebekonzentrationen nur in einem von vier Hirnarealen, in den drei anderen Arealen blieben die T3-Konzentrationen aufgrund gegenregulatorischer Mechanismen konstant.

Insgesamt zeigt die vorliegende Untersuchung, dass die Messung von Schilddrüsenhormonkonzentrationen in subzellulären Fraktionen pharmakologische Effekte entdecken kann, die bei Messungen der Hormonkonzentrationen in Homogenaten übersehen werden. Das wichtigste Teilergebnis sind deutliche Hinweise auf die Wirkung verschiedener Antidepressiva und Phasenprophylaktika in subzellulären Strukturen der Amygdala.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Schilddrüsenhormone und Gehirn.....	1
1.1.1 Aufnahme und Verteilung.....	1
1.1.2 Metabolismus der Schilddrüsenhormone.....	1
1.1.3 Wirkungen von Schilddrüsenhormonen im Gehirn.....	4
1.1.3.1 Effekte an nukleären Rezeptoren.....	4
1.1.3.2 Extranukleäre Effekte von Schilddrüsenhormonen.....	5
1.1.3.2.1 Effekte an Mitochondrien.....	5
1.1.3.2.2. Effekte von T3 auf die neuronale Erregungsleitung.....	6
1.2 Schilddrüsenhormone und manisch-depressive Erkrankungen.....	8
1.2.1 Psychiatrische Syndrome bei Schilddrüsenerkrankungen.....	8
1.2.2 Serumkonzentrationen von Schilddrüsenhormonen bei manisch-depressiven Erkrankungen.....	9
1.2.3 Effekte antidepressiver Therapien auf die Serumkonzentrationen von Schilddrüsenhormonen.....	10
1.2.4 Antidepressive Effekte von Schilddrüsenhormonen.....	12
1.2.5 Effekte von Antidepressiva und Phasenprophylaktika auf den Schilddrüsenhormonmetabolismus und die Schilddrüsenhormonkonzentrationen im ZNS der Ratte.....	14
1.2.6 Effekte verschiedener Stressoren sowie nicht-antidepressiv wirksamer Pharmaka auf den Schilddrüsenhormonmetabolismus und die Schilddrüsenhormonkonzentrationen im ZNS der Ratte.....	16
1.3 Antidepressive und phasenprophylaktisch wirksame Medikamente.....	19
1.4 Zusammenfassung der Fragestellungen der vorliegenden Arbeit.....	22
1.5 Methodische Ziele und Fragestellungen.....	25

2. Material und Methoden.....	26
2.1 Materialien.....	26
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	27
2.1.3 Medikamente.....	30
2.1.4 Versuchstiere.....	30
2.2 Methoden.....	31
2.2.1 Methodische Entwicklungen.....	31
2.2.1.1 Subzelluläre Fraktionierung.....	31
2.2.1.1.1 Homogenisierung.....	32
2.2.1.1.2 Zentrifugation des Homogenats.....	32
2.2.1.1.3 Isolierung der Zellkerne.....	33
2.2.1.1.4 Isolierung der Mitochondrien.....	35
2.2.1.1.5 Isolierung der Synaptosomen und der Myelinfraktion.....	36
2.2.1.1.6 Hypoosmotische Behandlung der Myelinfraktion zur Reduktion zytoplasmatischer Kontaminationen.....	36
2.2.1.1.7 Präparation der Mikrosomen.....	37
2.2.1.2 Charakterisierung der subzellulären Fraktionen durch biochemische Marker.....	37
2.2.1.2.1 DNA-Isolierung und Quantifizierung.....	37
2.2.1.2.2 Messung der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität.....	38
2.2.1.2.3 Messung der 2',3'-zyklischen-Nukleotid 3'-Phosphohydrolase.....	39
2.2.1.2.4 Messung der NADPH-Cytochrom c-Reduktase-Aktivität.....	40
2.2.1.2.5 Messung der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität.....	41
2.2.1.2.6 Messung der Konzentrationen von Synapsin, Syntaxin und des Glutamattransporters I durch Westernblots.....	41
2.2.1.3 Charakterisierung der subzellulären Fraktionen durch Elektronenmikroskopie.....	43
2.2.1.4 Weitere Untersuchungen zur Überprüfung der Validität der Hormonquantifizierung in subzellulären Fraktionen.....	43
2.2.1.4.1 Subzelluläre Fraktionierung unter Zugabe von T3.....	44

2.2.1.4.2	Subzelluläre Fraktionierung von Hirnarealen Desipramin-behandelter Tiere unter Zugabe von radioaktiv-markiertem T3.....	44
2.2.1.5	Extraktion, Isolierung und Reinigung der Schilddrüsenhormone mittels HPLC (High pressure liquid chromatographie).....	44
2.2.2	Versuchstiergruppen.....	46
2.2.2.1	Kontrolltiere.....	47
2.2.2.2	Subchronische Behandlung mit Antidepressiva.....	47
2.2.2.3	Behandlung mit phasenprophylaktischen Medikamenten.....	48
2.2.2.4	Schlafentzug.....	48
2.2.2.5	Untersuchung Stressfaktoren (i.p.-Injektionen).....	49
2.2.2.6	Induktion einer hypothyreoten und einer hyperthyreoten Stoffwechsellage.....	50
2.2.2.7	Hirnpräparation.....	50
2.2.3	Radioimmunologische Bestimmung (RIA) der 3,5-T2-, T3- und T4-Konzentrationen.....	53
2.2.3.1	Messung der 3,5-T2-, T3- und T4-Konzentrationen in subzellulären Fraktionen.....	53
2.2.3.2	Serumbestimmungen von T3 und T4.....	55
2.2.4	Quantitative Proteinbestimmung.....	57
2.2.5	Statistische Auswertung.....	57
3	Ergebnisse.....	59
3.1	Methodik der subzellulären Fraktionierung.....	59
3.1.1	Isolierung der Zellkerne.....	59
3.1.2	Isolierung der Mitochondrien.....	60
3.1.3	Isolierung des Myelins.....	60
3.1.4	Isolierung der Synaptosomen.....	61
3.1.5	Isolierung der mikrosomalen Fraktion.....	62
3.1.6	Aktivität der Laktat-Dehydrogenase.....	63
3.1.7	Weitere Untersuchungen.....	64

3.1.7.1	Konzentrationen des Glutamattransporters I in subzellulären Fraktionen.....	64
3.1.7.2	Subzelluläre Fraktionierung unter Zugabe von T3.....	65
3.1.7.3	Subzelluläre Fraktionierung von Hirnarealen Desipramin- behandelter Tiere unter Zugabe von radioaktiv-markiertem T3.....	66
3.1.7.4	Absolute Gehalte an Trijodthyronin in Homogenaten, vereinten Überständen und subzellulären Fraktionen des Hippocampus.....	67
3.2	Basale Schilddrüsenhormonkonzentrationen in subzellulären Fraktionen von Rattenhirnarealen.....	68
3.3	Effekte von antidepressiven Pharmaka auf die Schilddrüsenhormon- konzentrationen in subzellulären Fraktionen.....	71
3.4	Effekte von Lithium und Carbamazepin auf die Schilddrüsenhormon- konzentrationen in subzellulären Fraktionen.....	82
3.5	Effekte eines Schlafentzugs auf die Schilddrüsenhormonkonzentrationen in subzellulären Fraktionen.....	83
3.6	Effekte der verschiedenen antidepressiven und phasenprophylaktischen Behandlungsformen auf die Proteinkonzentrationen der subzellulären Fraktionen.....	83
3.7	Funktionelle Untersuchungen.....	84
3.8	Effekte von akutem und chronischem Stress auf die Schilddrüsenhormon- konzentrationen in subzellulären Fraktionen.....	85
3.9	Effekte verschiedener antidepressiver Pharmaka, der Behandlung von phasenprophylaktischen Medikamenten, von Schlafentzug und von chronischem und akutem Stress auf die T3- und T4-Serumspiegel.....	90
3.10	Schilddrüsenhormonkonzentrationen in subzellulären Fraktionen bei Hypothyreose und bei Hyperthyreose.....	92
3.11	Weitere Ergebnisse.....	98
4	Diskussion.....	99
4.1	Methodische Überlegungen.....	99
4.2	Effekte von Antidepressiva, Phasenprophylaktika und Schlafentzug.....	105
4.3	Effekte von Phasenprophylaktika	110

4.4	Effekte eines Schlafentzugs.....	111
4.5	Das Hirnareal Amygdala.....	111
4.6	Effekte verschiedener Stressfaktoren.....	115
4.7	Messung der Schilddrüsenhormonkonzentrationen und physiologische Parameter bei Hypothyreose und Hyperthyreose.....	117
4.8	Zusammenhänge zwischen Aktivitäten der Dejodaseisoenzyme und Schilddrüsenhormonkonzentrationen.....	118
5	Literaturverzeichnis.....	120
6	Publikationsliste.....	136

Danksagung