

**DER EINFLUSS SEROTONERGER STIMULATION AUF  
DIE MIGRATION PERIPHERER LEUKOZYTEN UNTER  
BERÜCKSICHTIGUNG DER POTENZIELLEN  
MEDIATORROLLE VON PROLAKTIN**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
an der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Paul F. Fäßler  
aus Regensburg

Gießen 2000

Aus der Abteilung für Differentielle Psychologie und Diagnostik  
Leiterin: Prof. Dr. phil. Dr. med. P. Netter  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. P. Netter

Gutachter: PD Dr. A. Matzdorff

Tag der Disputation: 18.09.2001

für Margrit

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	1
<b>2 Theoretischer Teil</b> .....	4
<b>2.1 Das serotonerge System</b> .....	4
2.1.1 Anatomie des serotonergen Systems .....	5
2.1.1.1 Afferenzen des Serotoninsystems .....	7
2.1.1.2 Efferenzen des Serotoninsystems .....	7
2.1.2 Serotoninrezeptoren .....	11
2.1.3 Aufbau und Signalübermittlung an serotonergen Synapsen .....	16
2.1.4 Serotonerge Funktionen und klinische Bedeutung.....	17
2.1.5 Serotonin (5-HT) und Immunsystem .....	21
2.1.5.1 Allgemeines zum Einfluss von 5-HT auf das Immunsystem .....	21
2.1.5.2 Serotonerge Wirkungen auf das zelluläre Immunsystem.....	23
2.1.6 Die serotonerg vermittelte Prolaktin-Stimulation .....	25
2.1.6.1 Anatomische und physiologische Grundlagen .....	25
2.1.6.2 Die 5-HT-Rezeptor vermittelte Prolaktin-Sekretion .....	27
<b>2.2 Das Peptidhormon Prolaktin (PRL)</b> .....	30
2.2.1 Geschichte, Aufbau und Physiologie .....	30
2.2.2 Regulation der Sekretion .....	32
2.2.2.1 Regulation durch hemmende und stimulierende endogene Faktoren auf hypophysäres PRL.....	32

2.2.2.2	Pharmakologische Einflüsse auf den PRL-Spiegel.....	35
2.2.2.3	Umwelteinflüsse auf die PRL-Sekretion.....	37
2.2.2.4	Zelluläre Mechanismen der PRL-Freisetzung.....	40
2.2.3	Biologische Funktionen und Einflüsse von PRL auf den Organismus.....	41
2.2.4	Extrahypophysäres PRL – Syntheseorte und Funktion.....	42
2.2.5	Der PRL-Rezeptor und die intrazelluläre Signaltransduktion .....	45
2.2.5.1	Überblick über die Eigenschaften des PRL-Rezeptors .....	45
2.2.5.2	Lokalisation des Rezeptors.....	45
2.2.5.2.1	PRL-Rezeptoren exprimierende Gewebe.....	45
2.2.5.2.2	PRL-Rezeptoren auf Zellen des Immunsystems.....	46
2.2.5.3	Aufbau des PRL-Rezeptors .....	47
2.2.5.4	Regulation der PRL-Rezeptorexpression.....	49
2.2.5.5	Intrazelluläre Signaltransduktion.....	49
2.2.5.6	Bedeutung des Interferon-regulierenden-Faktors 1 (IRF-1).....	52
<b>2.3</b>	<b>PRL und Immunsystem .....</b>	<b>53</b>
2.3.1	Beeinflussung der Immunkompetenz.....	53
2.3.1.1	Einfluss auf den Thymus.....	56
2.3.1.2	PRL als Gegenspieler zu Glucocorticoiden.....	57
2.3.1.3	PRL und Transplantatabstoßungsreaktionen.....	59
2.3.2	Wirkung von PRL und hormonartig wirkenden Substanzen auf das Immunsystems .....	60
2.3.2.1	Wirkung auf Granulozyten .....	60
2.3.2.2	Wirkung auf Monozyten .....	63
2.3.2.3	Wirkung auf Lymphozyten .....	64
2.3.2.3.1	Wirkung auf T-Lymphozyten .....	65
2.3.2.3.2	Wirkung auf B-Lymphozyten .....	67

2.3.2.4 Wirkung auf NK-Zellen.....	69
2.3.3 Die Rolle von extrahypophysärem PRL für die Immunreguation.....	70
2.3.4 Hyperprolaktinämie und Autoimmunerkrankungen .....	72
<b>2.4 Ableitung der Fragestellungen .....</b>	<b>74</b>
<b>3 Methoden .....</b>	<b>80</b>
<b>3.1 Ort und Zeit der Versuche .....</b>	<b>80</b>
<b>3.2 Versuchspersonen.....</b>	<b>80</b>
3.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien.....	80
3.2.2 Ablauf der Probandenrekrutierung.....	81
<b>3.3 Das Pharmakon dex-Fenfluramin .....</b>	<b>81</b>
<b>3.4 Versuchsdesign .....</b>	<b>84</b>
<b>3.5 Messverfahren.....</b>	<b>85</b>
3.5.1 Erhebung der zellulären immunologischen Parameter .....	85
3.5.2 Bestimmung des endokrinen Parameters Prolaktin .....	87
3.5.3 Cortisolbestimmung aus dem Speichel.....	88
3.5.4 Weitere Messwerte .....	88
<b>3.6 Beschreibung des Versuchsablauf .....</b>	<b>89</b>
<b>3.7 Definition und Beschreibung des PRL-Baselinewertes.....</b>	<b>93</b>
<b>3.8 Statistische Auswertung .....</b>	<b>94</b>
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>95</b>
4.1 Ergebnisse aus dem Versuchsablauf.....	95
4.2 Die Zunahme des Serumprolaktinspiegels nach d-Fen.....	96
4.3 Die Veränderung des Cortisolwertes nach d-Fen .....	99

<b>4.4</b>	<b>Änderung der absoluten Zahlen der peripheren Leukozyten nach serotonerger Stimulation durch dex-Fenfluramin</b> .....	101
4.4.1	Änderung der Gesamtzahl der peripheren Leukozyten.....	102
4.4.2	Änderung der Anzahl der Granulozyten.....	103
4.4.3	Änderung der Anzahl der Monozyten.....	107
4.4.4	Änderung der Anzahl der Lymphozyten.....	109
4.4.4.1	Änderung der Gesamt-, der T- und B-Lymphozytenanzahlen.....	109
4.4.4.2	Änderung der CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -Lymphozytenanzahlen.....	112
<b>4.5</b>	<b>Änderung der prozentualen Anteile der Leukozyten nach serotonerger Stimulation durch dex-Fenfluramin</b> .....	114
4.5.1	Änderung der prozentualen Anteile der Granulozyten .....	114
4.5.2	Änderung der prozentualen Anteile der Monozyten .....	116
4.5.3	Änderung der prozentualen Anteile der Lymphozyten .....	117
4.5.3.1	Änderung des prozentualen Anteils der T- und B-Lymphozyten an der Zahl der gesamten Lymphozyten.....	119
4.5.3.2	Änderung des prozentualen Anteils der CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> -Zellen zur Zahl der gesamten T-Lymphozyten .....	120
<b>4.6</b>	<b>Der Zusammenhang der Veränderungsmaße von PRL mit den Veränderungsmaßen der Leukozyten</b> .....	122
4.6.1	Der Zusammenhang der Veränderung von PRL mit der absoluten Anzahl der Leukozytenpopulationen.....	123
4.6.2	Der Zusammenhang der Veränderung von PRL mit der des prozentualen Anteils der Leukozytenpopulationen .....	126
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	129
<b>5.1</b>	<b>Diskussion des dex-Fenfluramin induzierten PRL-Anstiegs</b> .....	129
5.1.1	Diskussion der mittels RIA gemessenen PRL-Werte .....	129

5.1.2	Diskussion der serotonerg induzierten Mechanismen der PRL-Freisetzung.....	130
5.1.3	Diskussion eines direkten oder indirekten PRL-Anstiegs.....	132
<b>5.2</b>	<b>Diskussion der dex-Fenfluramin induzierten Cortisolveränderungen.....</b>	<b>135</b>
<b>5.3</b>	<b>Vergleich der Ansprechrate von PRL und Cortisol auf eine serotonerge Stimulation durch dex-Fenfluramin .....</b>	<b>137</b>
<b>5.4</b>	<b>Diskussion methodischer Aspekte .....</b>	<b>137</b>
<b>5.5</b>	<b>Diskussion der dex-Fenfluramin induzierten Zellzahl- veränderung an peripheren Leukozyten.....</b>	<b>139</b>
5.5.1	Diskussion der Auswirkung der d-Fen-Stimulation auf Granulozyten .....	140
5.5.2	Diskussion der Auswirkung der d-Fen-Stimulation auf Monozyten .....	141
5.5.3	Diskussion der Auswirkung der d-Fen-Stimulation auf Lymphozyten .....	142
5.5.4	Diskussion der Auswirkung der d-Fen-Stimulation auf B-Lymphozyten.....	143
5.5.5	Diskussion der Auswirkung der d-Fen-Stimulation auf T-Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> -Zellen .....	144
5.5.6	Zusammenfassende Beurteilung der Zellveränderung unter d-Fen.....	148
<b>5.6</b>	<b>Diskussion der Abläufe die eine Zellzahlveränderung in der peripheren Blutzirkulation hervorrufen können .....</b>	<b>148</b>
<b>5.7</b>	<b>Diskussion möglicher Mechanismen der Vermittlung zwischen dem stimulierten zentralen serotonergen System und der peripheren Immunzellverschiebung.....</b>	<b>150</b>
5.7.1..	Prolaktin als Vermittler .....	151
5.7.2	Cortisol als Vermittler.....	153
5.7.3	Serotonin als Vermittler.....	154
5.7.4..	Dex-Fenfluramin als Vermittler.....	154

---

5.7.5	Endogene Opiode als Vermittler .....	155
5.7.6	Das vegetative Nervensystem als Vermittler .....	159
5.7.7	Zytokine als Vermittler .....	160
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>162</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>164</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>180</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>188</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>189</b>

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### 1. Verzeichnis der Abbildungen im Text:

Abbildung 1: Interaktionen von ZNS, Immunsystem u. endokrinem System..	S. 1
Abbildung 2: Strukturformel von Serotonin .....	S. 4
Abbildung 3: Serotonerge Kerngebiete und Projektionen im ZNS .....	S. 5
Abbildung 4: Aufsteigende serotonerge Projektionen aus den Raphekernen	S. 8
Abbildung 5: Absteigende 5-HT-Fasern mit Zielgebieten im Rückenmark ....	S. 10
Abbildung 6: Serotonerge Synapse .....	S. 17
Abbildung 7: Serotonerge Funktionen .....	S. 18
Abbildung 8: Hypothalamus und Hypophyse .....	S. 26
Abbildung 9: PRL-Spiegel im zirkadianen Verlauf .....	S. 38
Abbildung 10: PRL-Rezeptorsubtypen und AS-Kettenlänge .....	S. 48
Abbildung 11: Intrazelluläre Signaltransduktion im PRL-Rezeptor .....	S. 50
Abbildung 12: PRL-Konzentration und Lymphozytenproliferation .....	S. 54
Abbildung 13: Gleichgewicht zw. PRL und Glucocorticoiden auf das IS .....	S. 58
Abbildung 14: Strukturformel von Fenfluramin .....	S. 82
Abbildung 15: Ermittelte Zellpopulationen .....	S. 86
Abbildung 16: Zeitlicher Versuchsablauf .....	S. 90
Abbildung 17: Aufbau der Versuchsräumlichkeiten.....	S. 91
Abbildung 18: Verlauf der Mittelwerte der PRL-Konzentrationen .....	S. 97
Abbildung 19: Veränderung der PRL-Werte zur Baseline .....	S. 98
Abbildung 20: Verlauf der Mittelwerte der Cortisolkonzentrationen.....	S. 99
Abbildung 21: Aufgliederung der Leukozyten .....	S. 101
Abbildung 22: Veränderung der gesamten Leukozyten .....	S. 102
Abbildung 23: Veränderung der absoluten Zahl der Granulozyten	
a) Neutrophile .....	S. 104
b) Eosinophile .....	S. 104
c) Basophile .....	S. 105
Abbildung 24: Prozentuale Veränderung der Granulozyten zur Baseline .....	S. 106
Abbildung 25: Veränderung der absoluten Zahl der Monozyten .....	S. 108
Abbildung 26: Veränderung der Lymphozyten	
a) Gesamtlymphozyten .....	S. 109
b) B-Zellen .....	S. 110
c) T-Zellen .....	S. 110
Abbildung 27: Prozentuale Veränderung der Lymphozyten zur Baseline .....	S. 111
Abbildung 28: Veränderung der absoluten Zahl der CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -Zellen ...	S. 112
Abbildung 29: Prozentuale Veränderung der CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> -Zellen zur Baseline	S. 113
Abbildung 30: Prozentuale Anteile der Granulozyten unter d-Fen .....	S. 114
Abbildung 31: Prozentuale Anteile der Monozyten unter d-Fen .....	S. 116
Abbildung 32: Prozentuale Anteile der Gesamtlymphozyten unter d-Fen .....	S. 118
Abbildung 33: Prozentuale Anteile der B- und T-Lymphozyten unter d-Fen ....	S. 119
Abbildung 34: Prozentuale Anteile der CD4 <sup>+</sup> / CD8 <sup>+</sup> -Zellen unter d-Fen .....	S. 121
Abbildung 35: Korrelation der Veränderung von PRL und B-Zellen (absolut) ..	S. 125
Abbildung 36: Korrelation von PRL und CD4 <sup>+</sup> -Zellen Veränderung (absolut) ..	S. 125
Abbildung 37: Korrelation von PRL- und B-Zellen-Veränderung (prozentual)	S. 128

Fortsetzung:

Abbildung 38: Zirkadianer Rhythmus für Lymphozyten und Cortisol .....	S. 143
Abbildung 39: Prozentualer CD4 <sup>+</sup> Anteil nach Ipsapirongabe .....	S. 144
Abbildung 40: Cortisol i. Speichel nach Ipsapiron .....	S. 145
Abbildung 41: CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> -Ratio nach d-Fen bzw. Placebo .....	S. 147

## **2. Verzeichnis der Tabellen im Text:**

Tabelle 1: Afferenzen serotonerger Neurone .....	S. 7
Tabelle 2: Zielgebiete aufsteigender 5-HT-Projektionen u. Funktionen .....	S. 9
Tabelle 3: 5-HT-Rezeptoren und Subtypen .....	S. 11
Tabelle 4: 5-HT-Rezeptoren auf Immunzellen .....	S. 23
Tabelle 5: Endogene Substanzen mit Einfluss auf den PRL-Spiegel .....	S. 32
Tabelle 6: Pharmakologische Einflüsse auf den PRL-Spiegel .....	S. 36
Tabelle 7: a) PRL-Rezeptor-exprimierende Immunzellen .....	S. 46
b) PRL-Rezeptor-exprimierende Immungewebe .....	S. 47
Tabelle 8: Prozentuale Verteilung der Granulozyten .....	S. 60
Tabelle 9: Einteilung der Lymphozyten .....	S. 65
Tabelle 10: Versuchsplan .....	S. 85
Tabelle 11: PRL-Konzentrationen der Baselinewerte B1 .....	S. 96
Tabelle 12: Zweifaktorielle Varianzanalyse (PRL-Konzentration) .....	S. 98
Tabelle 13: Zweifaktorielle Varianzanalyse (Cortisolkonzentration) .....	S. 100
Tabelle 14: Zweifaktorielle Varianzanalyse (Gesamtleukozyten) .....	S. 102
Tabelle 15: Zunahme der Leukozyten ab Baseline .....	S. 103
Tabelle 16: Zweifaktorielle Varianzanalyse (Granulozyten absolut) .....	S. 105
Tabelle 17: Zweifaktorielle Varianzanalyse (Monozyten absolut) .....	S. 108
Tabelle 18: Zweifaktorielle Varianzanalyse (Lymphozyten absolut) .....	S. 110
Tabelle 19: Zweifaktorielle Varianzanalyse (CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> -Zellen absolut) ..	S. 113
Tabelle 20: Zweifaktorielle Varianzanalyse (Granulozyten prozentual) .....	S. 115
Tabelle 21: Zweifaktorielle Varianzanalyse (Monozyten prozentual) .....	S. 117
Tabelle 22: Zweifaktorielle Varianzanalyse (Lymphozyten prozentual) .....	S. 118
Tabelle 23: Zweifaktorielle Varianzanalyse (B- und T-Zellen prozentual) .....	S. 120
Tabelle 24: Zweifaktorielle Varianzanalyse (CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> -Zellen prozentual) ....	S. 122
Tabelle 25: Pearson-Korrelation (PRL – absolute Zellzahlen) .....	S. 123
Tabelle 26: Pearson-Korrelation (PRL – prozentuale Zellanteile) .....	S. 126
Tabelle 27: Vergleich von Mittelwerten der PRL-Konzentrationen .....	S. 129
Tabelle 28: Überblick von serotonergen Provokationsstudien .....	S. 131
Tabelle 29: Steroidwirkungen auf das Immunsystem .....	S. 135

## Abkürzungen

<b>5-CT</b>	5-Carboxyamidotryptamin
<b>5-HIAA</b>	5-Hydroxyindolessigsäure (5-HT-Abbauprodukt), auch 5-HIES
<b>5-HT</b>	5-Hydroxytryptamin $\cong$ Serotonin
<b>5-HTT</b>	5-HT-Transporter (präsynaptischer 5-HT-Wiederaufnahme-Transportmechanismus)
<b>8-OH-DPAT</b>	8-Hydroxy-N,N-dipropyl-2-aminotetralin (unspezifischer 5-HT-Rezeptor-Agonist)
<b>ACh</b>	Acetylcholin
<b>ACTH</b>	Adrenokortikotropes Hormon
<b>AK</b>	Antikörper
<b>AMP</b>	Adenosin-Monophosphat
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>Bag-1</b>	Bcl-2-associated anti-death gene
<b>BCR</b>	Bromocriptin (Dopaminagonist)
<b>ConA</b>	ConcanavalinA (Immunstimulans)
<b>CyA</b>	Cyclosporin-A
<b>DA</b>	Dopamin
<b>d-Fen</b>	dex-Fenfluramin (z.B. Isomeride®)
<b>d-LSD</b>	d-Lysergsäurediäthylamid
<b>DNA</b>	DNS (Desoxyribonucleinsäure)
<b>DOB</b>	4-Bromo-2,5-dimethoxyamphetamin (5-HT-Rezeptor-Agonist)
<b>DOI</b>	4-Iodo-2,5-dimethoxyamphetamin (5-HT-Rezeptor-Agonist)
<b>EEG</b>	Elektroenzephalogramm
<b>EPO</b>	Erythropoetin
<b>GABA</b>	Gamma-Amino-Buttersäure
<b>GH</b>	Growth hormon, Wachstumshormon
<b>GnRH</b>	Gonadotropin-Releasing-Hormon
<b>HHN</b>	Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinde
<b>hPRL</b>	humanes Prolaktin
<b>HVL</b>	Hypophysenvorderlappen
<b>HWZ</b>	Halbwertszeit
<b>i.c.v.</b>	Intracerebroventriculär
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>i.S.</b>	im Serum
<b>i.v.</b>	Intravenös
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IRF</b>	Interferon-regulierender Faktor
<b>IS</b>	Immunsystem
<b>JAK</b>	Janus tyrosine kinase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>LAK-Zellen</b>	Lymphokin-aktivierte-Killer-Zellen
<b>LH</b>	Luteinisierendes Hormon
<b>LIA</b>	Lumineszenz-Immuno-Assay
<b>LK</b>	Lymphknoten
<b>LPS</b>	Lipopolysacharid

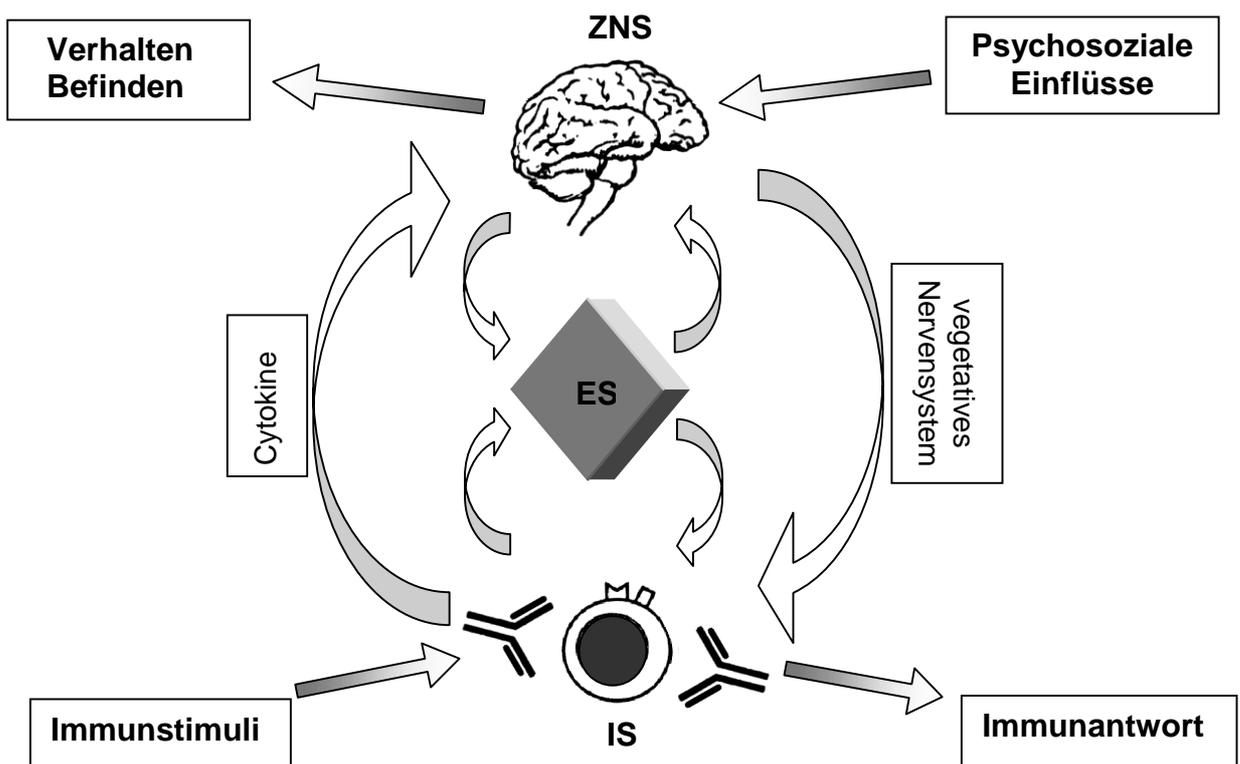
---

<b>MAO</b>	Monoaminoxidase
<b>MCP</b>	Metoclopramid (Dopaminrezeptorantagonist)
<b>m-CPP</b>	meta-Chlorophenylpiperazin (5-HT-Rezeptor-Agonist)
<b>MIF</b>	Makrophagen-Inhibitions-Faktor
<b>MK-212</b>	6-Chloro-2-(1-Piperazinyl)-Pyrazin (5-HT-Rezeptor-Agonist)
<b>m-RNA</b>	Messenger-RNA
<b>n.s.</b>	nicht signifikant
<b>NA</b>	Noradrenalin
<b>Ncl.</b>	Nucleus
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killerzellen
<b>ODC</b>	Ornithin-Decarboxylase [*10 S.416]
<b>PAK-Zellen</b>	Prolaktin aktivierte Killer Zellen
<b>PBL</b>	Peripheral blood lymphocytes
<b>PBMC</b>	Peripheral blood mononuclear cells
<b>PCPA</b>	Para-Chlorphenylalanin (Serotoninsynthsehemmer durch Hemmung der Tryptophan-Hydroxylase)
<b>PHA</b>	Phytohämagglutinin
<b>PIF</b>	Prolaktin inhibitions Faktor
<b>PLP</b>	Prolactin-like protein
<b>PMN</b>	Polymorphkernige Granulozyten
<b>PRF</b>	Prolactin releasing factor
<b>PRL</b>	Prolaktin
<b>PRL-R</b>	Prolaktin Rezeptor
<b>REM-Schlaf</b>	Rapid-eye-movement Schlaf
<b>RF</b>	Releasing-Faktor
<b>RIA</b>	Radio-Immuno-Assay
<b>SLE</b>	Systemischer Lupus erythematodes
<b>SRBC</b>	Sheep-red-blood-cells (Schafserythrozyten)
<b>SSRI</b>	Selektiver-Serotonin-Reuptake-Inhibitor
<b>Stat</b>	Signal transducers and activators of transcription
<b>TCR</b>	T-Zell-Rezeptor
<b>TEC</b>	Thymic epithelial cell (Thymusepithelzelle)
<b>TH0/1/2</b>	T-Helferzelle 0/1/2 (CD4 <sup>+</sup> -T-Zell-Subpopulationen)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
<b>TRH</b>	Tyreotropin-Releasing-Hormon
<b>TRP</b>	Tryptophan
<b>VIP</b>	Vasoaktives intestinales Peptid
<b>zit. n.</b>	zitiert nach
<b>ZNS</b>	Zentralnervensystem

## 1. Einleitung

Diese Arbeit entstand im Rahmen eines Forschungsprojekts der Abteilung „Differentielle Psychologie“ der Justus-Liebig-Universität Gießen. Ziel des Projekts war es, die Folgen einer Stimulation des serotonergen Neurotransmittersystems auf das Immunsystem, das endokrine System und das Verhalten unter Berücksichtigung von Persönlichkeitsmerkmalen zu untersuchen und näher darzustellen.

Multiple Zusammenhänge zwischen Nerven-, Immun-, und Hormonsystem sind schon Anfang des 20. Jahrhunderts vermutet worden. Auch erste Berichte über den Einfluss von psychisch-emotionalen Belastungen auf Zellen des Immunsystems (IS) stammen aus dieser Zeit (Loepper & Crouzon 1904, Wittkower 1929, beide zit. n. Coccaro et al., 1996).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Interaktion zwischen dem Nervensystem (ZNS), dem endokrinen System (ES) und dem Immunsystem (IS). Die Kommunikation der miteinander verflochtenen Komponenten erfolgt mittels Hormonen, Zytokinen, Neuropeptiden und Neurotransmittern aus dem ZNS und dem vegetativen Nervensystem.

Jedoch konnte erst die Entwicklung verfeinerter biologisch-chemischer Messverfahren etwas Licht in diese interessanten Verknüpfungen bringen. Empirische Befunde aus dem Bereich der Psychoneuroimmunologie belegen immer mehr Details, dass Nerven-, Immun- und Hormonsystem nicht voneinander unabhängige Systeme des Organismus darstellen, sondern in einem komplexen biochemischen Netzwerk miteinander in Kontakt stehen. Die Beziehungen dieser drei Systeme untereinander lässt sich schematisch wie in Abbildung 1 darstellen.

Über psychische Einflüsse auf die Immunfunktion berichten zahlreiche psychoneuroimmunologische Studien, die, grob zusammengefasst, eine Verminderung immunologischer Funktionen bei chronischen Stressbelastungen aufzeigen, während akute psychische Belastungen oder auch kurzzeitige physische Belastungen einen stimulierenden Effekt haben. So konnten bei Personen im Prüfungsstreß, aber auch Personen, deren Lebenspartner verstorben war, verminderte zelluläre und humorale Immunfunktionen gezeigt werden (Kiecolt 1991, Schleifer 1993, beide zit.n. Schedlowski, 1995.). Erklärt werden solche Prozesse durch eine zentralnervöse Verarbeitung eines Stresssignals, der eine hormonvermittelte Modulation des Immunsystems folgt. Die Mehrzahl der endokrinen Parameter wie Cortisol, Prolaktin, Serotonin, Adrenalin und  $\beta$ -Endorphin - um nur einige Beispiele zu nennen - reagieren einerseits sensitiv auf zentrale Änderungen (z.B. Stress) und können auf der anderen Seite rezeptorvermittelte Immunfunktionen beeinflussen. Die Wirkung dieser Parameter auf Immunfunktionen konnte durch den Nachweis von spezifischen Rezeptoren für o.g. Stoffe auf den verschiedensten Zellen des IS bestätigt werden. Hinweise auf einen morphologisch-anatomischen Zusammenhang für eine externe Beeinflussung des IS durch das ZNS gibt z.B. die Versorgung primärer und sekundärer lymphatischer Organe (Knochenmark, Thymus bzw. Lymphknoten, Milz) mit Nervenfasern des autonomen Nervensystems (Felten et al., 1987). Läsionen bestimmter Hirnregionen verändern darüberhinaus die Immunfunktion des Organismus.

Aber auch in umgekehrter Richtung, also vom IS zum Zentralnervensystem (ZNS), gibt es Regulationsmechanismen. So sezernieren aktivierte Lymphozyten hormonähnliche Substanzen und Zytokine (z.B. Interleukine oder Interferon), die modulierend auf das ZNS einwirken können (Blalock, 1990) und dort, insbesondere in Arealen des Hypothalamus, eine Aktivierung beispielsweise serotonerger Neurone oder eine Änderung im Rezeptorstatus erreichen.

Obwohl sich das Wissen um diese netzartigen biochemischen Verflechtungen der drei bidirektional kommunizierenden Komponenten (ZNS, ES, IS) allmählich er-

weitert, bedarf es noch weiterer Erkenntnisse auf diesem Gebiet, so dass sich eventuelle klinische Einsatzmöglichkeiten daraus ergeben können.

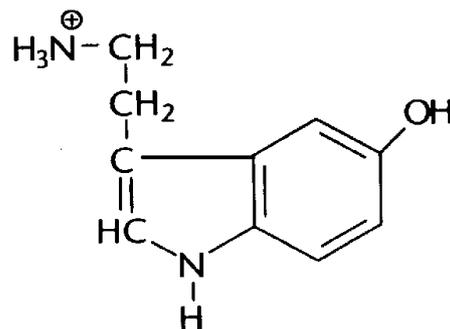
Eine sich in den letzten Jahren abzeichnende bedeutende Rolle in der Interaktion zwischen dem ZNS und dem IS kommen dem Hormon Prolaktin (PRL) und dem Neurotransmitter Serotonin (auch 5-Hydroxytryptamin oder 5-HT) zu. Für beide Substanzen, die sich auch gegenseitig beeinflussen, konnten Rezeptoren sowohl im ZNS als auch auf peripheren Immunzellen nachgewiesen werden.

Gegenstand der hier durchgeführten Studie ist die Frage der serotonergen Stimulierbarkeit des Individuums in Hinblick auf die dadurch ausgelösten endokrinen, immunologischen und behavioralen Veränderungen. Der zuletzt genannte Punkt wurde in ausführlicher Weise durch andere Arbeiten innerhalb dieses Projekts beschrieben. In dieser Arbeit soll auf den potentiellen Prolaktin-vermittelten serotonergen Einfluss auf die Migration peripherer Lymphozyten eingegangen werden. Nur ca. 4% der menschlichen Lymphozyten zirkulieren im Blut, der Rest befindet sich hauptsächlich in den lymphatischen Organen und im Knochenmark. Die Migration kann durch Stimuli zu einer Änderung des zirkulierenden Lymphozytenanteils führen. Die serotonerge Stimulation erfolgte in einer placebokontrollierten cross-over Studie mittels einer einmaligen Gabe des Serotonin-Releasers und -Reuptakeinhibitors *dex-Fenfluramin* an 40 gesunden, männlichen Versuchsteilnehmern. Im theoretischen Teil der Arbeit sollen nun zunächst Serotonin und Prolaktin sowie deren Einflüsse insbesondere auf das Immunsystem näher dargestellt werden.

## 2. Theoretischer Teil

### 2.1 Das serotonerge System

Serotonin oder auch 5-Hydroxytryptamin (5-HT), ein biogenes Amin, wirkt einerseits als Neurotransmitter im ZNS, andererseits hat es eine große Bedeutung als Hormon in der Peripherie des Organismus wie z.B. im Gastrointestinaltrakt oder als Mediator bei der Blutstillung (Karlson, Doenecke & Koolman, 1994; Kuschinsky & Lüllmann, 1989). Es leitet sich von der Aminosäure Tryptophan ab und entsteht durch Hydroxylierung in 5-Stellung sowie anschließender Decarboxylierung (Kreutzig, 1993). Der Abbau erfolgt durch die Monoaminoxidasen (MAO) zu 5-Hydroxy-indolessigsäure (5-HIAA), welche ausgeschieden wird (Kuschinsky et al., 1989). Abbildung 2 zeigt die chemische Strukturformel von 5-HT:



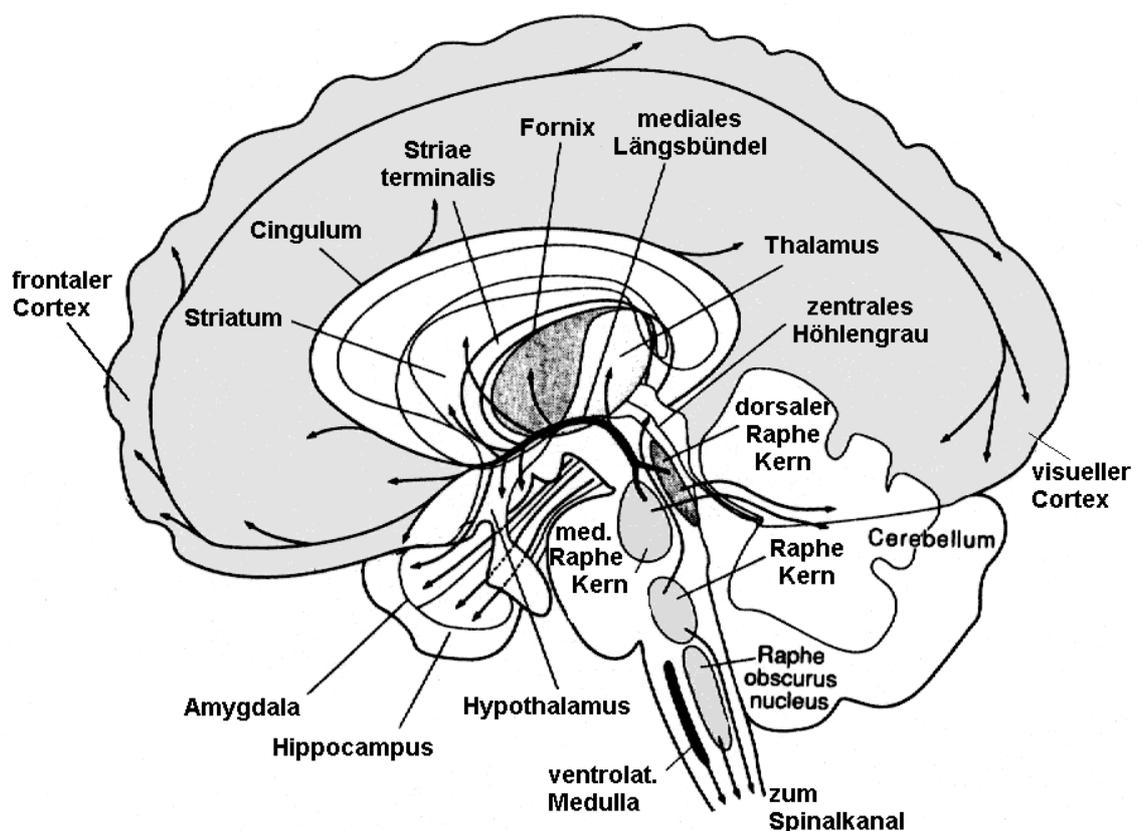
**Abbildung 2:** Chemische Strukturformel von Serotonin (5-Hydroxytryptamin)

Serotonin kommt bei Säugetieren, so auch beim Menschen, in hohen Konzentrationen im ZNS vor und zwar insbesondere im Hypothalamus, Mittelhirn, Nucleus caudatus und am Boden des 4. Ventrikels, also phylogenetisch alten Regionen des Gehirns (Kuschinsky et al., 1989). Weiterhin findet man hohe Konzentrationen in den enterochromaffinen Zellen der Darmschleimhaut, weshalb es gelegentlich auch als „Enteramin“ bezeichnet wird. Hier besteht seine Aufgabe hauptsächlich in der Regulation der Darmmotorik durch seine Wirkung auf die glatte Muskulatur. Im Blut enthalten vor allem die Thrombozyten erhebliche Mengen an 5-HT, das durch einen effektiven Transportmechanismus aus dem Plasma gewonnen wird, da eine eigene Synthese nicht möglich ist (Kuschinsky et al., 1989). Bei Verletzungen kommt es zur Freisetzung von Serotonin („*serum tonus*“!), was über eine Vasokonstriktion der glatten Gefäßmuskulatur zur Blutstillung beiträgt. Dieser aus dem „*Serum*“ stammende Faktor, der Einfluss auf den „*Tonus*“ der Gefäße hat, führte zum Namen „*Serotonin*“ (Jacobs & Azmitia, 1992).

Die Bedeutung von 5-HT beschränkt sich aber nicht nur auf die eben erwähnten Aufgaben, sondern ist weit vielfältiger. So kommt ihm weiterhin eine Bedeutung bei psychischen Prozessen, bei der Entstehung von Psychosen, bei physischen Funktionen und in der Immunmodulation zu (s. dazu auch Kapitel 2.1.4).

### 2.1.1 Anatomie des serotonergen Systems

Die Perikaryen der serotonergen Neurone liegen im Bereich der Raphekerne, des Rhombencephalons und in einigen Regionen der Formatio reticularis. Die Projektionen dieser Zellen sind fast in jedem Bereich des ZNS zu finden, jedoch in besonders hoher Dichte im Cortex, im limbischen System, in den Basalganglien, in Regionen des Hirnstammes und in der grauen Substanz des Rückenmarks. Vergleiche hierzu die Abbildung 3:



**Abbildung 3:** Schematischer Sagittalschnitt durch das menschliche Gehirn mit Darstellung der serotonergen Kerngebiete und Projektionen (Pfeile) in den Hirnstamm, das Prosencephalon und das Rückenmark. (abgeändert nach Törk, 1990, p.20)

Das serotonerge System kann hinsichtlich der anatomischen Ursprungsgebiete der serotonergen Neurone in zwei Untergruppen aufgeteilt werden: Das rostrale und das kaudale serotonerge System (Törk, 1990).

Die Zellkörper des *rostralen Systems*, deren Hauptprojektionen ins Prosencephalon und Diencephalon ziehen (s. Abbildung 3), liegen im Mittelhirn und im rostralen Pons und lassen sich in vier Hauptkerngebiete einteilen:

- Ncl. raphe dorsalis
- Ncl. raphe medialis
- Ncl. caudatus
- Serotonerge Neurone in der pontomesencephalen *Formatio reticularis*

Die Zellkörper des *kaudalen serotonergen Systems* befinden sich überwiegend in der Medulla oblongata und dem kaudalen Pons. Die absteigenden Projektionen ziehen ins Rückenmark (s. Abbildung 5). Dieses System lässt sich in fünf Hauptkerngebiete einteilen:

- Ncl. raphe magnus
- Ncl. raphe pallidus
- Ncl. raphe obscurus
- Ncl. lateralis paragigantocellularis (ventrolaterale Medulla)
- Serotonerge Neurone außerhalb der Raphekerne (z.B. Area postrema)

Im Laufe ihrer Entwicklung wachsen rostrales und kaudales serotonerges System aufeinander zu, sodass die Grenze zwischen den beiden Systemen nicht ganz exakt bestimmbar ist (Törk, 1990). Gemeinsam von beiden Systemen werden Regionen des Hirnstamms und des Cerebellums innerviert.

Es ist jedoch so, dass die serotonergen Kerngebiete nicht nur serotonerge Neurone enthalten, sondern auch verschiedene andere Neurone darin vorkommen. Aber die meisten Zellkörper mit langen Projektionen in andere Gebiete des ZNS sind serotonerger Natur (Jacobs & Azmitia, 1992). Ebenso wurde beobachtet, dass serotonerge Neurone nicht nur 5-HT gespeichert haben. Besonders in Kerngebieten der Medulla findet man neben 5-HT drei Neuropeptide in den Neuronen und zwar TRH, Substanz P und Enkephalin (Jacobs & Azmitia, 1992).

Die Bedeutung und Aufgabe dieser zusätzlichen Neuropeptide ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch wird davon ausgegangen, dass sie modulierend auf die 5-HT Signaltransduktion wirken und weiterhin Einfluss auf das Wachstum der serotonergen Nervenzellen haben (Jacobs & Azmitia, 1992).

### 2.1.1.1 Afferenzen des Serotoninsystems

Der Großteil der serotonergen Neurone liegt in den Raphekernen, von wo auch der überwiegende Teil der der Afferenzen ihren Ausgang nehmen. Aber es gibt auch nicht-serotonerge Nervenzellen, die mit den serotonergen über Synapsen in Verbindung stehen und so einen Einfluss auf diese ausüben können. Wichtige Afferenzen stammen aus motorischen und limbischen Arealen (Jacobs & Azmitia, 1992). Sie besitzen teils unterschiedliche Neurotransmitter, was in Tabelle 1 dargestellt ist. Informationen aus den motorischen und den limbischen Bereichen laufen daher in den serotonergen Neuronen zusammen, was ihnen eine Art Schnittstellenfunktion zukommen lässt.

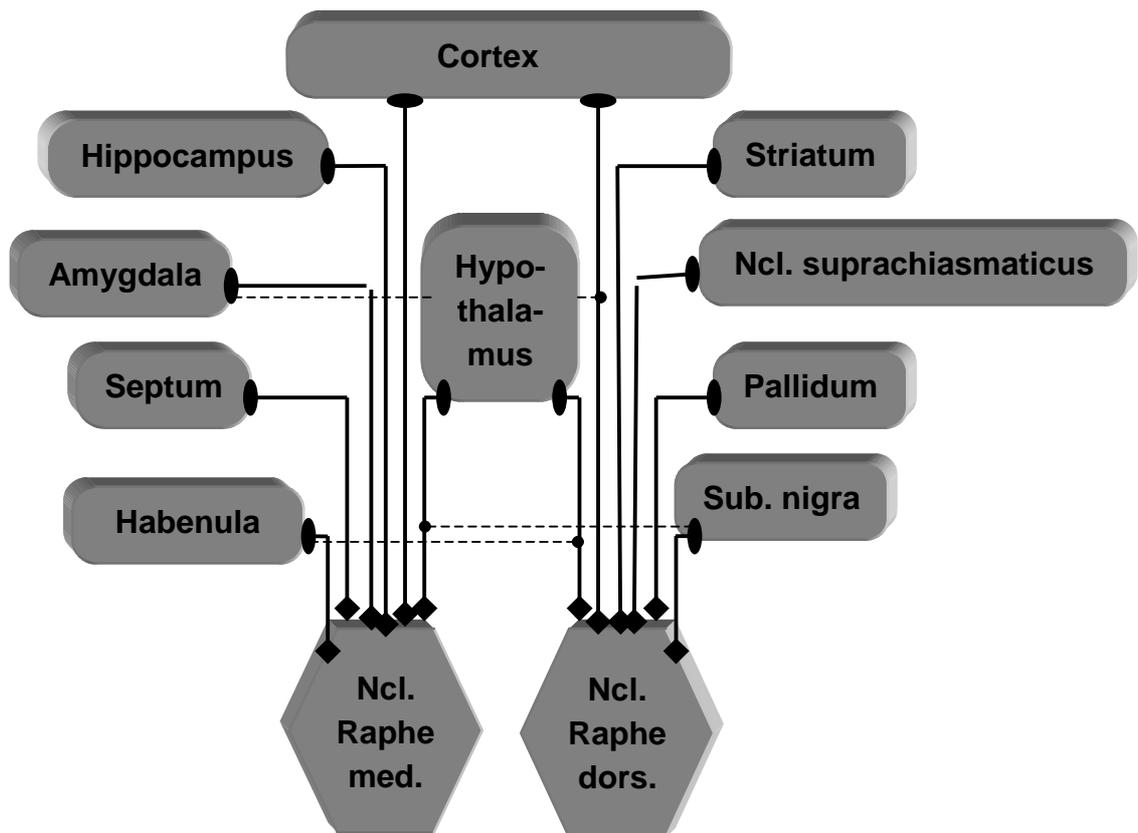
**Tabelle 1:** Afferenzen der serotonergen Neurone und ihre Neurotransmitter (Jacobs Azmitia, 1992).

Ursprungsgebiet der Afferenz	zugehöriger Neurotransmitter
Habenula	GABA
Hypothalamus	Histamin u.a.
Limbisches System (Habenula lateralis)	Glutamat
Locus coeruleus u. -subcoeruleus	Noradrenalin
Ncl. tractus solitarii, Ncl. propositus hypoglossi	Adrenalin
Ncl. vestibularis superior	Acetylcholin
Substantia nigra	Dopamin

### 2.1.1.2 Efferenzen des Serotoninsystems

#### ◆ Aufsteigende Projektionen:

Wie bereits weiter oben erwähnt, entspringen die aufsteigenden serotonergen Projektionen zum überwiegenden Teil aus den Ncll. raphe dorsalis und medialis. Diese Kerne sind nach Azmitia & Whitaker-Azmitia (1991) und Törk (1990) die Ursprungsorte der beiden aufsteigenden Hauptbündel serotonerger Fasern. Die folgende Abbildung 4 zeigt schematisch diese beiden Faserbündel und ihre Zielareale:



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der aufsteigenden serotonergen Projektionen aus dem medialen und dorsalen Raphekeern.  
 ( — ) = Hauptprojektion, ( - - - - ) = Nebenprojektion;  
 (in Anlehnung an Soubrié, 1986 p.321)

Die aufsteigenden Axone ziehen sehr weitläufig durch das ZNS und bilden zahlreiche Kollateralen. Ihre Ausdehnung reicht bis zum Cortex, den Basalganglien (Striatum [Nucleus caudatus, Putamen], Globus pallidus), dem limbischen System (Hippocampus) und dem Hypothalamus (Törk, 1990). Dabei werden Striatum, Ncl. caudatus und das laterale Septum primär von Fasern des dorsalen Ncl. raphe innerviert, Hippocampus und mediales Septum primär vom medialen Ncl. raphe (Soubrié, 1986). In zumindest geringer Dichte sind serotonerge Fasern fast in jeder Gehirnregion nachweisbar (Azmitia & Whitaker-Azmitia, 1991).

Funktion und Aufgaben dieser Zielgebiete sind im komplexen Netzwerk der Neurone eines Gehirns bisher nur sehr bruchstückhaft verstanden. Dennoch lassen sich einigen umschriebenen Gebiete gewisse Funktionen zuschreiben, was in der folgenden Tabelle 2 zum Ausdruck kommt:

**Tabelle 2:** Zielareale aufsteigender 5-HT Projektionen ausgehend von den Ncll. Raphe dorsalis et medialis und einige ihnen zugeordnete Funktionen (Azmitia & Whitaker-Azmitia, 1991; Törk, 1990; Sommermeyer, 1993).

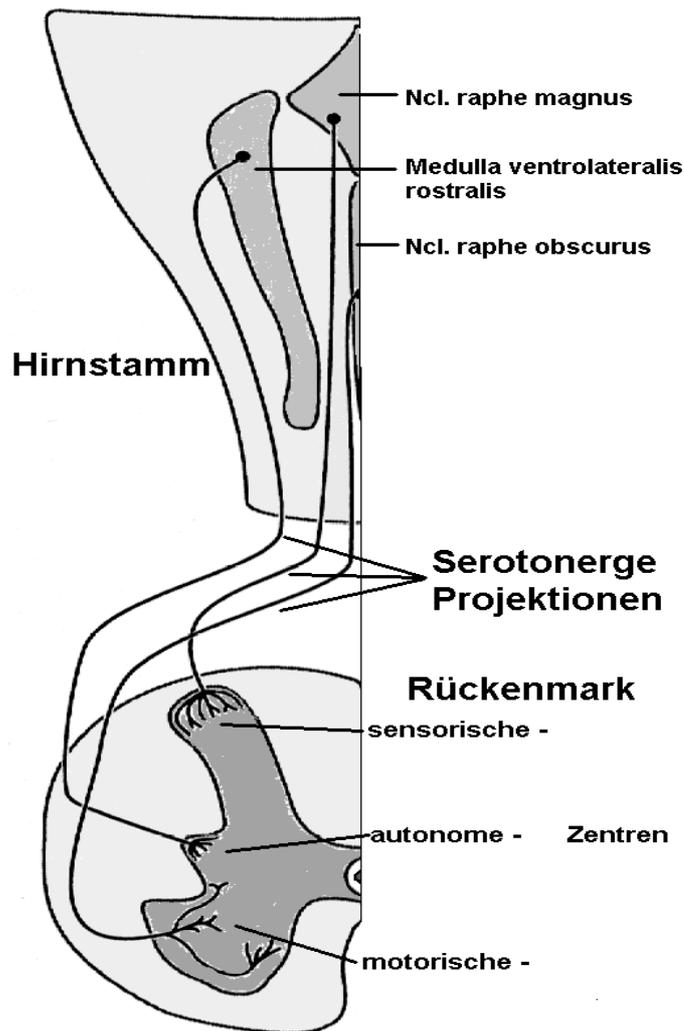
Zielgebiet aufsteigender serotonerger Projektionen	Zugeschriebene Funktion(en)
Hypothalamus ventromedialer Teil dorsolateraler Teil	Regulation der Nahrungsaufnahme Regulation der Körpertemperatur und Innervation neuroendokriner Zellen
Ncl. suprachiasmaticus	Steuerung zirkadianer Periodik
Limbisches System Hippocampus, Ncl. medialis amygdalae	Regulation emotionaler Prozesse
Telencephalon Gyrus calcarinus Gyrus temporalis superior Amygdalakomplex	visuell sensorisches Areal auditorisch sensorisches Areal olfaktorisch sensorisches Areal

Die aufsteigenden Fasern unterscheiden sich auch in morphologischer Hinsicht: Fasern, die aus dem Ncl. raphe medialis stammen, besitzen relativ dicke Axone, von denen kurze dünne Kollaterale abzweigen, die große runde Endknöpfchen besitzen. Sie bilden zahlreiche Synapsen und sog. 5-HT-Körbchendigungen, welche die Perikaryen oder Dendriten der Zielzellen umschließen. Diese sind GABAerge Neurone, die zum extrapyramidalen System gehören (Törk, 1990). So kann ein Einfluss auf den inhibitorischen Regelkreis der GABAergen Neurone ausgeübt werden.

Aufsteigende Fasern des Ncl. raphe dorsalis bilden stark verzweigte dünne Axone mit vielen kleinen spindelförmigen Auftreibungen. Ob es bei diesen Axonen zu synaptischen Verknüpfungen mit anderen Zellen kommt, ist nicht geklärt. Wahrscheinlicher ist, dass sie den Transmitter ohne eine synaptische Verbindung freisetzen (Törk, 1990).

#### ♦ Absteigende serotonerge Projektionen

Die absteigenden serotonergen Fasern stammen überwiegend aus den Ncll. raphe magnus et obscurus und ziehen dort in die graue Substanz des Rückenmarks (Törk, 1990). Eine hohe Axondichte findet man dabei im Hinterhorn, im Vorderhorn und im Seitenhorn der thorakalen Wirbelsäule (Bowker, Westlund, Sullivan & Coulter, 1982); siehe hierzu auch Abbildung 5:



**Abbildung 5:** Schema der deszendierenden serotonergen Fasern aus dem Hirnstamm in die Zielgebiete des Rückenmarks (modifiziert n. Törk, 1990 p. 29)

Insbesondere Projektionen des Ncl. raphe magnus sind stark an der Innervation der Subst. gelatinosa des Rückenmarks beteiligt. Diese stehen in Verbindung zu Neuronen des Tractus spinothalamicus im Hinterhorn und sind daher an der Modulation der Schmerzleitung beteiligt (Törk, 1990). Serotonin kann dabei die Schmerzwahrnehmung herabsetzen. Die motorischen Neurone des Vorderhorns, dessen Axone zur Muskulatur ziehen, werden durch serotonerge Projektionen aus dem Ncl. raphe obscurus innerviert. Interessanterweise enthalten diese Neurone neben 5-HT auch noch TRH und die Substanz P (Jacobs & Azmitia, 1992).

Ausgehend von den Perikaryen der ventrolateralen Medulla oblongata werden parasympathische Neurone innerviert, was mit einem Blutdruckanstieg einhergeht (Azmitia & Whitaker-Azmitia, 1991).

### 2.1.2 Serotoninrezeptoren

Die Anzahl der identifizierten 5-HT-Rezeptoren und Rezeptorsubtypen ist in den letzten Jahren extrem angestiegen, wobei auch in Zukunft noch weitere Rezeptor(sub)typen durch verfeinerte Techniken genauer charakterisiert werden können. Bisher sind sieben Hauptfamilien der Serotoninrezeptoren beschrieben; mindestens 16 Rezeptoren und Subtypen wurden identifiziert und sequenziert (Mossner & Lesch, 1998). Die große Rezeptorvielfalt verdeutlicht die Bedeutung und Wirkungsbreite von Serotonin in der Peripherie und noch viel mehr im ZNS.

In der folgenden Tabelle 3 soll ein Überblick über die bisher identifizierten und charakterisierten membrangebundenen 5-HT-Rezeptoren geben werden. Dabei wird aber nur auf die im Menschen nachgewiesenen Typen eingegangen. Rezeptoren mit ähnlichen Charakteristika sind dabei zu sog. Rezeptorfamilien zusammengefasst. Es werden neben der anatomischen Lokalisation hoher Rezeptordichten auch die jeweils wichtigen physiologischen (außer 5-HT) und pharmakologischen Agonisten sowie Antagonisten für die Rezeptoren genannt. Diese sind in einigen Fällen eher rezeptorspezifisch, in anderen Fällen können diese Agonisten bzw. Antagonisten sehr selektiv mit einzelnen Rezeptorfamilien(subtypen) reagieren und eignen sich damit für pharmakologische Untersuchungen.

Der früher als 5-HT<sub>1C</sub> bezeichnete Rezeptor wurde der 5-HT<sub>2</sub>-Familie zugeteilt und wird heute als 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor in der Literatur geführt (Humphrey, Hartig & Hoyer, 1993). Der 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptor ist bisher nur bei Nagern nachgewiesen worden und wird deshalb nicht näher erläutert. Sein entsprechender Rezeptor beim Menschen ist der 5-HT<sub>1Dβ</sub>-Rezeptor.

**Tabelle 3:** Übersicht über die 5-HT-Rezeptorklassifikation und wichtige Charakteristika der einzelnen Rezeptorsubtypen soweit bekannt. (Substanzen sind in ihrer gebräuchlichen Abkürzung angegeben und werden am Ende der Tabelle durch Fußnotenverweis erläutert. Quellen sind ebenfalls am Ende der Tabelle in alphabetischer Reihenfolge nach Erstautor angegeben.)

Rezeptor-Familie	5-HT <sub>1</sub>			
Rezeptor-Subtyp	5-HT <sub>1A</sub>	5-HT <sub>1Dα,β</sub>	5-HT <sub>1E</sub>	5-HT <sub>1F</sub>
<b>Transduktionsmechanismus</b>	Hemmung der Adenylatcyclase			
<b>zentrale Areale hoher Dichte</b>	Hippocampus Ncl. raphe Cortex Amygdala in Neuronen u. Astrozyten	Frontalcortex Globus pallidus Ncl. caudatus Putamen Subst. nigra Collic. superior	Putamen Ncl. caudatus Frontalcortex Thrombozyten	
<b>Periphere Areale</b>	NK-Zellen B-Zellen aktivierte T-Zellen Monoz./Makroph.	Aa. basilaris, coronaria V. saphena		
<b>Agonisten</b>	8-OH-DPAT <sup>1</sup> Ipsapiron Buspiron (= auch DA <sub>2</sub> -Antagonist) 5-CT <sup>2</sup> MK-212 <sup>6</sup>	5-CT <sup>2</sup> Sumatriptan	RU 24969	Sumatriptan
<b>Antagonisten</b>	Pindolol Propranolol Spiperon	Mianserin Methiothepin Yohimbin Rauwolscin	Methiotepin	Methiotepin
<b>Neuronale Lokalisation</b>	Autorezeptor: -Zellkörper -Dendriten Postsynaptisch Präsynaptisch: -Heterorezeptor	Autorezeptor: -Terminal Präsynaptisch: -Heterorezeptor		
<b>Membraneffekt</b>	Hyperpolarisation	?		
<b>Physiologische u. klinische Bedeutung:</b> - Stimulation	Appetit ↑ Körpertemp. ↓ Sexualtrieb ↓ REM-Schlaf ↓ Blutdruck ↓ Anxiolyse ↑ Depression ↓ Modulation Immunsystem ↓ Endokrino. Sys Zirkadianrhythmik	Autorezeptor (Reduktion d. 5-HT Synthese)  Präsynapt. Heterorezeptor (ACh- u. NA- Freisetzung ↓)  Migräne ↓		
- Inhibition				

Fortsetzung Tabelle 3:

Rezeptor-Familie	5-HT <sub>2</sub>		
Rezeptor-Subtyp	5-HT <sub>2A</sub>	5-HT <sub>2B</sub>	5-HT <sub>2C</sub>
<b>Transduktionsmechanismus</b>	Erhöhung des Phosphoinositol-Turnovers durch Stimulation der Phospholipase C		
<b>zentrale Areale hoher Dichte</b>	(Neo)Cortex Olfakt. System Amygdala Clastrum Rückenmark	Cortex	Pl. choroideus Limb. System Cortex Rückenmark Subst. nigra
<b>periphere Areale</b>	glatte Muskulatur im GIT u. Gefäßen Thrombozyten	B-Zellen T-Zellen Monozyten/Makrophagen	besitzen 5-HT <sub>2B</sub> und/oder 5-HT <sub>2C</sub> -Rezeptoren
<b>Agonisten</b>	DOB <sup>4</sup> DOI <sup>5</sup> MK-212 <sup>6</sup> α-Methyl-5-HT	α-Methyl-5-HT	DOI <sup>5</sup> DOB <sup>4</sup> α-Methyl-5-HT MK-212 <sup>6</sup> m-CPP <sup>7</sup> (partial)
<b>Antagonisten</b>	Ketanserin Ritanserin Amesergid Methysergid Mianserin Pirenperon Clozapin d-LSD <sup>3</sup>	Mianserin Ketanserin Spiperon Methysergid Metergolin	Ritanserin Amesergid Mesulergin Mianserin Spiperon Fluoxetin Norfluoxetin d-LSD <sup>3</sup> Methysergid
<b>Neuronale Lokalisation</b>	Postsynaptisch (insb. auf GABA- u. ACh-Neurone)	Postsynaptisch	Postsynaptisch
<b>Membraneffekt</b>	Depolarisation	Depolarisation	Depolarisation
<b>Physiologische u. klinische Bedeutung:</b>	Körpertemperatur ↓ Blutdruck ↑ Gefäßkontraktion Thrombozytenaggregation		Schlaf ↑ Appetit ↓ Körpertemperatur(↑) Sexualtrieb ↑ Modulation des Endokrinal. Systems
<b>-Inhibition</b>	REM-Schlaf ↓ Antipsychotischer Effekt ↑ Blutdruck ↓		Appetit ↑

Fortsetzung nächste Seite:

Fortsetzung Tabelle 3:

Rezeptor-Familie	5-HT <sub>3</sub>	5-HT <sub>4</sub>
Rezeptor-Subtyp		
<b>Transduktionsmechanismus</b>	Kationenkanal	Stimulation der Adenylatcyclase
<b>zentrale Areale hoher Dichte</b>	Hippocampus Area postrema (Frontal)Cortex Rückenmark (Sub. gelatinosa) Vagus kern Thalamus	Colliculus cran. superiores Striatum Hippocampus
<b>periphere Areale</b>	periph. Nervensystem (N.vagus) B-Zellen T-Zellen	Colon, Harnblase, Nebenniere, Atrium
<b>Agonisten</b>	Chlor-phenyl-biguanid 2-Methyl-5-HT	Metoclopramid Zacoprid Cisaprid 5-CT <sup>2</sup> Renzaprid
<b>Antagonisten</b>	Ondansetron MDL 7222 Granisetron Dolasetron Tropisetron	Tropiseron GR125487
<b>Neuronale Lokalisation</b>	-Präsynaptisch: Heterorezeptor (auf DA-, NA-, ACh-Axonen) -Postsynaptisch (u.a. auf GABAergen Neuronen)	Postsynaptisch
<b>Membraneffekt</b>	Depolarisation	Depolarisation
<b>Physiologische u. klinische Bedeutung:</b>	Blutdruck	Gedächtnisleistung↑ Zentrale Schmerzwahrnehmung Beteiligung bei Arrhythmie Beteiligung am Reizdarmsyndrom
<b>-Stimulation</b>		
<b>-Inhibition</b>	Übelkeit u. Erbrechen↓ Anxiolyse↑	

Fortsetzung nächste Seite:

Fortsetzung Tabelle 3:

Rezeptor-Familie	5-HT <sub>5</sub>		5-HT <sub>6</sub>	5-HT <sub>7</sub>
	5-HT <sub>5A</sub>	5-HT <sub>5B</sub>		
<b>Transduktionsmechanismus</b>	G-Protein-Kopplung		Stimulation der Adenylatcyclase	Stimulation der Adenylatcyclase
<b>zentrale Areale hoher Dichte</b>	gesamtes Gehirn (fraglich beim Menschen)		Olfakt. Tuberkel Striatum Ncl. accumbens Hippocampus	ZNS
<b>periphere Areale</b>				Glatte Muskulatur Milz B-Zellen
<b>Agonisten</b>			LSD 5-Methoxytryptamin	8-OH-DPAT
<b>Antagonisten</b>			Ro 04-6790 (selektiv) Methiothepin Clozapin Mianserin Ritanserin	
<b>Neuronale Lokalisation</b>	Postsynaptisch		Postsynaptisch	Postsynaptisch
<b>Membraneffekt</b>				
<b>Physiologische u. klinische Bedeutung:</b>			Hohe Affinität für psychotrop wirkende Substanzen (z.B. Clozapin) → Anti-psychot. Effekt	-Hohe Affinität für psychotrop wirkende Substanzen (z.B. Clozapin, trizykl. Antidepressiva) -Einfluss auf zirkadianen Rhythmus -Schlaf -Beteiligung an Relaxation d. glatten Muskulatur

- 1) **8-Hydroxy-N,N-dipropyl-2-aminotetralin**    5) 4-Iodo-2,5-dimethoxyamphetamin  
 2) **5-Carboxyamidotryptamin**    6) 6-Chloro-2-(1-piperazinyl)-pyrazin  
 3) **d-Lysergsäurediäthylamid**    7) **meta-Chlorophenylpiperazin**  
 4) 4-Bromo-2,5-dimethoxyamphetamin

\*(Angaben in Tabelle 3 zusammenfassend nach: Aghajanian, Sprouse, Sheldon & Rasmussen, 1990; Andrade, 1998; Berendsen, 1991; Bockaert, Claeysen, Sebben & Dumis, 1998; Claeysen, Faye, Sebben, Bockaert & Dumis, 1998; Coccaro, Kavoussi, Oakes, Cooper & Hauger, 1996; Grimaldi et al., 1998; Hamblin, Guthrie, Kohen & Heidmann, 1998; Hamblin, Guthrie, Kohen & Heidmann, 1998; Heidmann, Metcalf, Kohen & Hamblin, 1997; Hoyer et al., 1994; Humphrey, Hartig & Hoyer, 1993; Kroeze & Roth, 1998; Leonard, 1992; Mossner & Lesch, 1998; Peroutka & Schmidt, 1992; Peroutka, Schmidt, Sleight & Harrington, 1990; Ruß, 1998; Sleight, 1998; Sleight, Boess, Bös & Bourson, 1998; Uphouse, 1997; Van de Kar, Rittenhouse, Li & Levey, 1996)

Weitere Rezeptoren, die bisher in die Literatur eingegangen sind und dort diskutiert werden, sollen hier nur kurz erwähnt werden, da ihre Bedeutung zum größten Teil noch ungeklärt ist:

- 5-HT<sub>P</sub> soll sich im Gastrointestinaltrakt befinden, wurde nach W. Kröze (1998) aber bisher noch nicht kloniert.
- Vom 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor sind von Claeysen et al. (1998) drei Splice-Varianten beschrieben, die als 5-HT<sub>4(a)</sub>, 5-HT<sub>4(b)</sub> und 5-HT<sub>4(e)</sub> bezeichnet werden. Mit höchster Wahrscheinlichkeit stammen diese drei Varianten aber nur von einem einzigen Gen ab (Bockaert, Claeysen, Sebben & Dumis, 1998). Der 5-HT<sub>4(a)</sub>-Rezeptor ist dabei v.a. im ZNS und Atrium cordis lokalisiert, der 5-HT<sub>4(e)</sub> bisher nur im ZNS gefunden worden (Claeysen, Faye, Sebben, Bockaert & Dumis, 1998).
- Der 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptor ist von Grimaldi et al. (1998) auch beim Menschen auf immunkompetenten Zellen (Lymphozyten) nachgewiesen worden.
- Auch vom 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptor sind drei Splicevarianten beschrieben. Beim Menschen sind dies 5-HT<sub>7(a)</sub>, 5-HT<sub>7(b)</sub> und 5-HT<sub>7(d)</sub> (Hamblin, Guthrie, Kohen & Heidmann, 1998; Heidmann, Metcalf, Kohen & Hamblin, 1997).

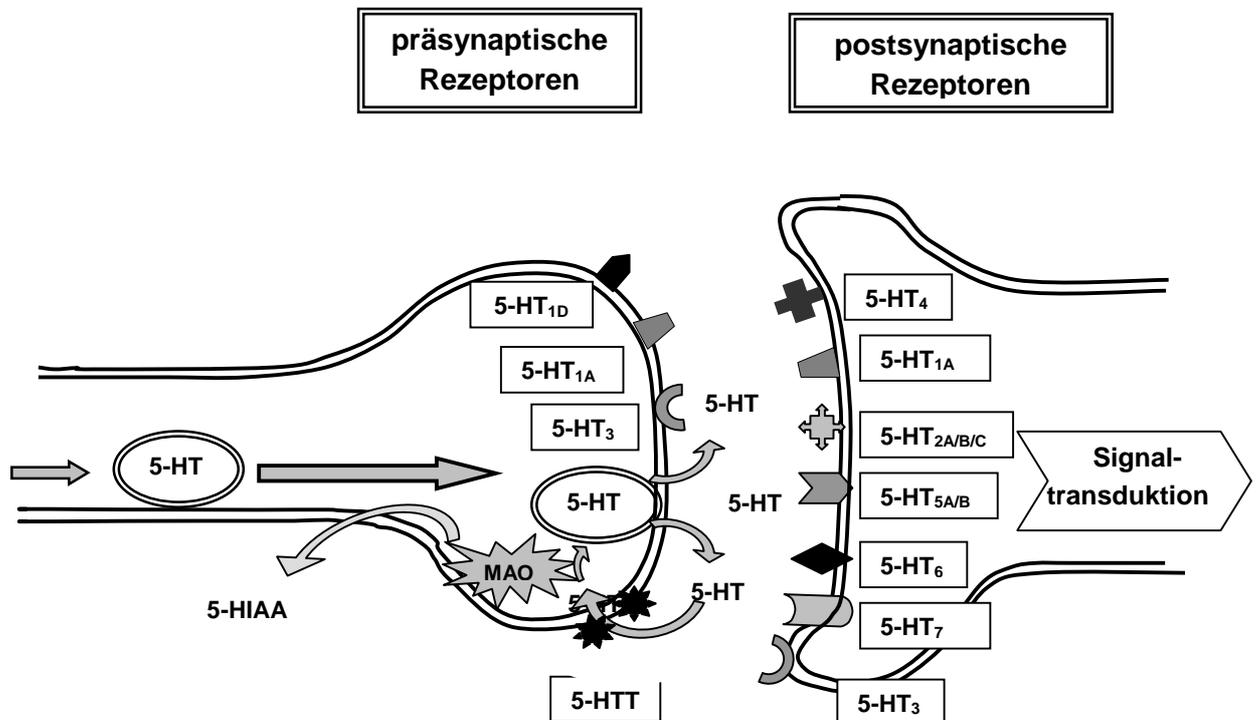
Derzeit ist noch nicht geklärt, warum sich im Laufe der Evolution derart viele 5-HT Rezeptoren gebildet und erhalten haben (Kroeze & Roth, 1998). Auf einzelnen Zellen, insbesondere im ZNS, können dabei verschiedene 5-HT- Rezeptoren sitzen; Andrade (1998) geht sogar davon aus, dass die meisten Neurone, die 5-HT-Rezeptoren exprimieren, gleich mehrere Subtypen ausbilden. Dies schafft die Möglichkeit einer subtileren und sensibleren Modifikation der Signalübertragung, da je nach Konzentration von 5-HT die Rezeptoren unterschiedlich stark besetzt und somit innerviert werden (Uphouse, 1997).

### **2.1.3 Aufbau und Signalübermittlung an serotonergen Synapsen**

Die nachstehende Abbildung 6 stellt stark vereinfacht und in schematischer Weise den Aufbau eines serotonergen Neurons und die Anordnung seiner prä- und postsynaptischen 5-HT-Rezeptoren dar:

Nach der Synthese im Zellkörper gelangt das 5-HT-Molekül auf axonalem Weg bis zur Synapse, wo es gespeichert wird. Das dort in Vesikeln gelagerte Serotonin wird nach einem nervalen Impuls in den synaptischen Spalt freigesetzt, von wo es per Diffusion sowohl zu den prä- als auch zu den postsynaptischen Rezeptoren gelangt. Die Aufhebung der Wirkung erfolgt durch die Wiederaufnahme von 5-HT in das Neuron selbst durch spezielle Rezeptoren oder durch enzymatischen Abbau. Dieser erfolgt durch das Enzym Monoaminoxidase (MAO). Beide Formen der MAO, MAO

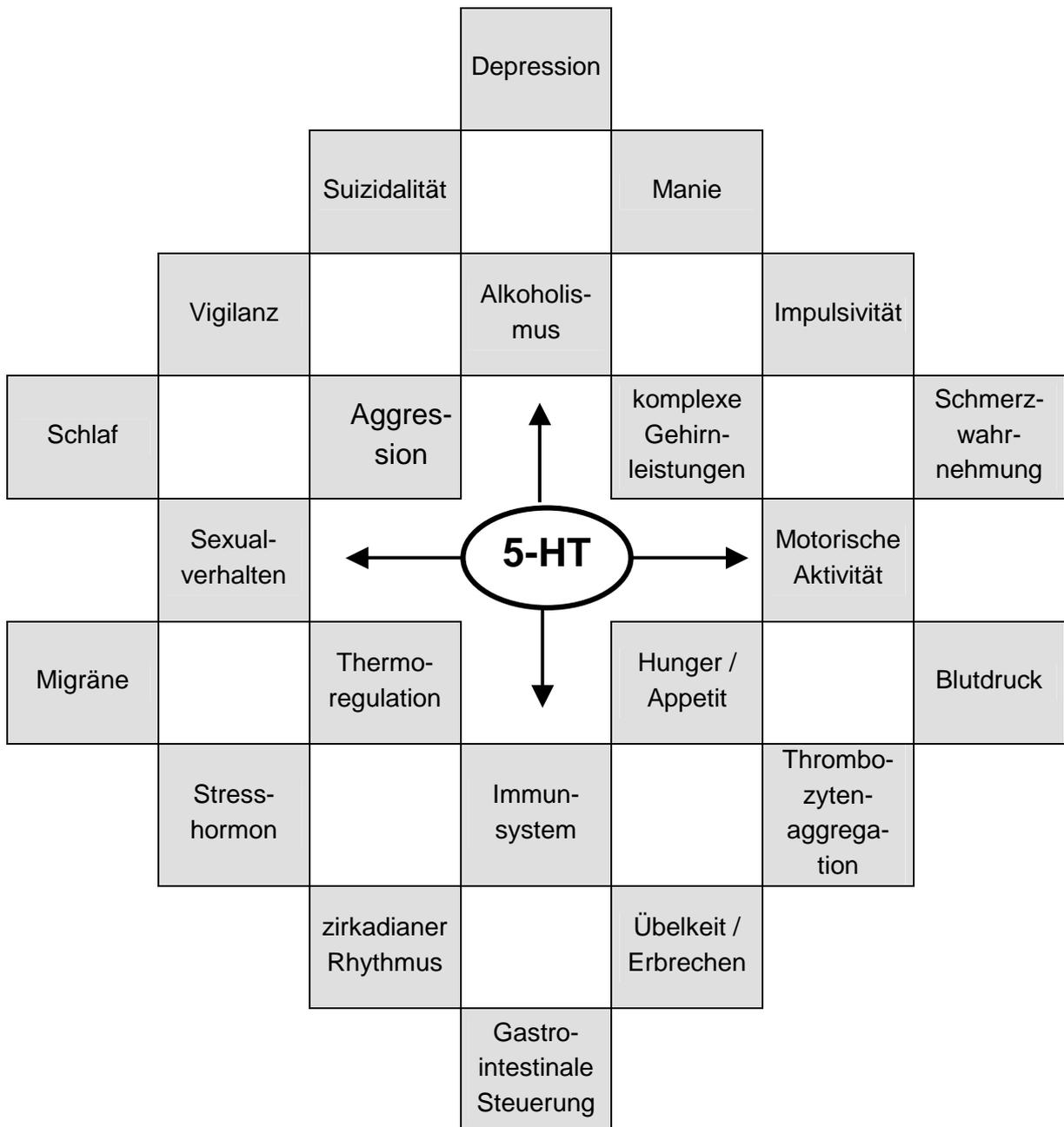
A und MAO B, können 5-HT als Substrat binden und zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) abbauen.



**Abbildung 6:** Schema einer serotonergen Synapse im ZNS mit Darstellung der Lokalisation verschiedener Rezeptorsubtypen. Doppelwandige Ovale=serotoninhaltige Vesikel; 5-HIAA = 5-Hydroxyindolessigsäure (Abbauprodukt von 5-HT); MAO = Monoaminoxidase A und B; 5-HTT = 5HT-Transporter (präsynaptischer 5-HT Reuptake-Transporter)

### 2.1.4 Serotonerge Funktionen und klinische Bedeutung

Abbildung 7 gibt einen Überblick über die vielfältigen Funktionen die Serotonin in unserem ZNS und der Peripherie ausübt. Bei all den genannten Beispielen (ohne Anspruch auf Vollständigkeit) ist jedoch 5-HT selten allein verantwortlich für die Funktionen, sondern hat in den komplexen Systemen einen modulierenden Effekt, der direkt oder indirekt unter Beteiligung weiterer Neurotransmittersysteme zu tragen kommt.



**Abbildung 7:** Aufgaben und Funktionen, an deren Steuerung oder Modulation 5-HT direkt oder indirekt beteiligt ist. Oben: Einflüsse auf psychische Faktoren. Unten: Einflüsse auf basale somatische Komponenten. (Erläuterungen s. Text). Zusammengestellt nach:

Azmitia & Whitaker-Azmitia, 1991; Jacobs & Azmitia, 1992; Baumgarten & Grozdanovic, 1995; Ewe & Karch, 1990; Weiss & Jelkmann, 1990; Berendsen, 1991; Leonard, 1992; Soubrié, 1986; Mossner & Lesch, 1998.

Wie bereits im Kapitel 2.1.2 beschrieben, gibt es eine Vielzahl von Serotoninrezeptoren, über die der Neurotransmitter 5-HT seine psychischen und physischen Wirkungen entfaltet bzw. modulierend in die verschiedenen Funktionen eingreift.

a) Beginnend mit den somatischen Komponenten, kann beispielsweise je nach Rezeptor(sub)typ und Dosis eine Hypotension mit Bradykardie (5-HT<sub>1A</sub>) oder eine **Hypertension** (5-HT<sub>2A</sub>) durch Stimulation erreicht werden. Neben der glatten Muskulatur des Gefäßsystems wird auch die des **Gastrointestinaltraks**, von Serotonin als postsynaptischem Transmitter mitgesteuert: es kommt zu einer Steigerung der Darmmotilität (Ewe & Karbach, 1990). Weiterhin werden große Mengen 5-HT in den enterochromaffinen Zellen der Darmmukosa gespeichert, deren Freisetzung auf einem sehr komplexen, rezeptorvermittelten Muster beruht (Racke, Reimann, Schworer & Kilbinger, 1996).

Im Rahmen der **Thrombozytenaggregation** kommt es zum Übertritt von Serotonin aus den Thrombozyten in das Plasma wo es mit vielen anderen Faktoren eine reversible in eine irreversible Thrombozytenaggregation überführt (Weiss & Jelkmann, 1990).

Hohe serotonerge Aktivität führt zu einer verminderten **Nahrungszufuhr**. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht geklärt (Curzon, Gibson, Kennedy & Oluymi, 1993). Curzon und Mitarbeiter (1993) berichten von einer Steigerung der Nahrungsaufnahme bei Ratten wenn diese mit 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten behandelt werden. Dabei kommt es in den Raphe-Kernen zu einer Aktivierung präsynaptischer 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren was eine extrazelluläre 5-HT-Reduktion zur Folge hat. Eine Verminderung des Appetits bzw. des Hungergefühls wird aber über die 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelt und wird bzw. wurde (s. Kapitel 3.2) therapeutisch beispielsweise mit dem Serotonin-Reuptakeinhibitor und -releaser dex-Fenfluramin im Rahmen einer Adipositas therapie eingesetzt (Baumgarten & Grozdanovic, 1995). Eine Störung des serotonergen Systems wird dabei auch in Zusammenhang mit der **Anorexia nervosa und der Bulimie** gebracht (Curzon, Gibson, Kennedy & Oluymi, 1993). Ein heute klinisch bedeutender Nutzen ist die Reduktion von **Übelkeit und Erbrechen** durch die sehr potenten 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorblocker (z.B. Ondansetron), wie sie als Begleitmedikation bei der Chemotherapie eingesetzt werden (Ruß, 1998). Eine andere Anwendung ist die von Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, sog. SSRI (z.B. Fluoxetin), zur Behandlung der Bulimia nervosa (Morant, 1996).

Die **Schmerzempfindung** bzw. die Schmerzempfindungsschwelle wird ebenfalls durch 5-HT moduliert. Hohe Serotoninspiegel oder Freisetzung wirken analgetisch, niedrige setzen die Schmerzschwelle herab. Klinisch können Schmerzen im Rahmen einer sog. Neuroleptanalgesie wirkungsvoll reduziert werden. Durch die Verwendung von Analgetika in Kombination mit Neuroleptika, die u.a. auch die Wiederaufnahme von Serotonin hemmen, kann ein erhöhter 5-HT-Spiegel erreicht werden, der für o.g. Wirkung verantwortlich ist. Ebenfalls wichtig, und heute aus der Therapie des akuten **Migräne**-Anfalls nicht mehr wegzudenken, sind die 5-HT<sub>1D</sub>-Rezeptor-Agonisten (z.B. Sumatriptan) (Ruß, 1998).

Weitere serotonerge Einflüsse, die experimentell untersucht sind, jedoch (noch) nicht Eingang in eine gängige klinische Therapien gefunden haben, betreffen die **Thermoregulation**. Chronische Behandlung mit 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten führt zu einer Reduktion der Körpertemperatur, vermutlich kommt es dabei zu einer Down-regulation der 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren, was in diesem Prozess mitwirkt (Hennig, Laschewski, Becker, Rammsayer & Netter, 1993; Baumgarten & Grozdanovic, 1995). Insgesamt ist die Temperaturregelung sehr differenziert zu betrachten, da sowohl Spezies- als auch Geschlechtsunterschiede und einige andere Faktoren hier eine Rolle spielen. Zusammenfassend kann man vermuten, dass 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren eher eine Hypothermie verursachen, während die 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren eher eine Hyperthermie bewirken (Leonard, 1992).

Der serotonerge Einfluss auf das **Immunsystem** wird ausführlicher im folgenden Kapitel 2.1.5 besprochen.

b) Im Rahmen psychischer Erkrankungen wird der Einfluß des serotonergen Systems beispielsweise in der Behandlung der **Depression** ausgenutzt. Es konnte gezeigt werden, daß eine tryptophanarme Diät zu depressiven Symptomen führen kann, während bei reichlicher Tryptophanzufuhr eine eher euphorische und anxiolytische Stimmung erreicht werden kann (Berendsen, 1991). Durch Gabe selektiver SSRI (z.B. Sertralin, Fluoxetin) kommt es, wie bei einer tryptophanreichen Diät, zu einer Anreicherung von 5-HT im synaptischen Spalt und dadurch zu einer verstärkten Stimulation von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren, was vermutlich für den antidepressiven Effekt verantwortlich zu sein scheint (Baumgarten & Grozdanovic, 1995; Morant, 1996). Kommt es zu einem Überangebot von 5-HT im synaptischen Spalt beispielsweise bei der Kombination von SSRI und MAO-Hemmern oder erhöhter Tryptophanzufuhr, kann sich ein lebensbedrohliches Krankheitsbild einstellen, das als „Serotonin-Syndrom“ bekannt ist. Es geht mit Halluzinationen, Hypomanie, psycho- und somatomotorischer Exzitation, Myoklonien, Hyperreflexie, und Hyperthermie einher (Baumgarten & Grozdanovic, 1995).

Eine wichtige Funktion im Rahmen **komplexer Leistungen des ZNS** kommt dem 5-HT durch seine Filterfunktion zu. Situationsrelevante Informationen aus dem Sinnesbereich, insbesondere des Gehörs, werden verstärkt gebahnt, während gleichzeitig unwichtige Störeinflüsse herausgefiltert werden (Baumgarten & Grozdanovic, 1995). Lernen, Gedächtnis, Kognition und Angstbewertung sind weitere Beispiele grundlegender Gehirnleistungen, die vom serotonergen System beeinflusst werden (Baumgarten & Grozdanovic, 1995).

Einige der 5-HT-Neurone besitzen eine eigene Schrittmacherfunktion, sodass sie je nach Vigilanzniveau des Individuums mit einer erstaunlich regelmässigen Rate von 1-5 Aktionspotentialen pro Sekund (Hz) „feuern“ (Jakobs et al., 1993, zit. n. Baum-

garten & Grozdanovic, 1995). Während des Schlafes wird das Aktivitätsmuster unregelmässig, bzw. kann es im **REM-Schlaf** sogar vollständig entfallen. Damit einhergehend kommt es zu einem fast kompletten Tonusverlust der Skelettmuskulatur. Der Zusammenhang mit dem 5-HT-Spiegel konnte in pharmakologischen Studien gezeigt werden. Gegen Ende des REM-Schlafs nehmen die 5-HT-Neurone ihre Impulsgabe wieder auf, und die Motoneurone werden wieder sensibilisiert (Jacobs & Azmitia, 1992; Baumgarten & Grozdanovic, 1995). Neben ihrem Einfluss auf die Dauer des REM-Schlafs konnten auch positive Einflüsse bei 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptorblockade auf den slow-wave-sleep (SWS) und die Schlafdauer nachgewiesen werden, was über die Demaskierung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren erklärt wird (Soubrié, 1986). Aufgrund dieser Schrittmacherfunktion wirkt Serotonin auch modulierend auf den **zirkadianen Rhythmus** ein.

In Tierversuchen konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Serotoninspiegel und dem **Aggressionsverhalten** gezeigt werden: Hohe 5-HT-Werte gehen mit einer Aggressionsreduktion und einem gesteigerten positivem Sozialverhalten einher, wobei dieser Effekt 5-HT<sub>1</sub>-vermittelt zu sein scheint (Bevan et al., 1989 und Saudou et al., 1994, beide zit. n. Baumgarten & Grozdanovic, 1995).

Eine geringe Impulskontrolle, also eine gesteigerte **Impulsivität** (bis hin zum auto-aggressivem Selbstmord) ist häufig mit einem zu niedrigem 5-HT-Spiegel vergesellschaftet (Coccaro, 1996a) und kann therapeutisch mit SSRI angegangen werden (Benkert, Wetzels & Szegedi, 1993).

Daneben werden einige weitere neuropsychiatrische Störungen in Zusammenhang mit funktionellen Unausgewogenheiten der zentralen Serotonintransmission gebracht. Dazu zählen u.a. Panikstörungen, Angststörungen, Alkoholismus, bipolare Störungen, Zwangsstörungen, Phobien, Schizophrenie, Essstörungen, M. Alzheimer und menstruationsbedingte Stimmungsänderungen (Murphy, Aulakh, Mazzola-Pomietto & Briggs, 1996; Meltzer, 1993).

## **2.1.5 Serotonin und Immunsystem**

### **2.1.5.1 Allgemeines zum Einfluss von 5-HT auf das Immunsystem**

Überblickt man die Literatur zum Thema Serotonin und Immunsystem, stellt man generell fest, dass ein erhöhter 5-HT-Spiegel bzw. eine verstärkte 5-HT-Aktivität mit einer dämpfenden Wirkung auf das Immunsystem einhergeht und umgekehrt. Jedoch gibt es Ausnahmen von dieser Regel, sodass ein komplexerer Mechanismus vermutet werden kann, der einer genaueren Betrachtung bedarf (Clancy, Fillion, Hellstrand & Lorens, 1993).

Eremina und Devoino (zit. n. Fillion et al., 1989) beobachteten 1973 im Tierexperiment, dass eine Reduktion des 5-HT-Spiegels im Gehirn durch Zerstörung der Raphe-Kerne zu einer verstärkten Immunreaktion des Organismus auf Rinderalbumin führte. Daraus wurde geschlossen, dass 5-HT einen zentralen inhibitorischen Effekt in der Immunregulation hat. Diese Hypothese stützend, konnten Jackson et al. (1985) zeigen, dass 5-HT die primäre Antikörperantwort auf Schafserythrozyten (SRBC) zum einen hemmte, und gleichzeitig eine gesteigerte Antwort festgestellt werden konnte nach der Gabe eines 5-HT-Synthese-Hemmers. Eine in vitro-Suppression von stimulierten humanen Lymphozyten durch 5-HT wurde von Bonnet et al. (1984) und Slauson et al. (1984) (beide zit. n. Fillion et al., 1989) nachgewiesen. Im Speziellen konnte dies auch an humanen T-Zellen gezeigt werden (Khan, Bhardwaj, Malla, Wattal & Agarwal, 1986).

Während nun eine erhöhte Serotoninaktivität einen dämpfenden Einfluss auf die Aktivität von Lymphozyten zu haben scheint, stellten 1987 Hellstrand und Hermoson (Hellstrand & Hermodson, 1987) den gegenteiligen Effekt, also eine Aktivierung, auf natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) fest.

Bei verschiedenen *lokalen* immunologischen Entzündungsreaktionen konnten beträchtliche Mengen an Serotonin festgestellt werden. Diese sind vermutlich das Resultat von Thrombozytenaggregationen und nachfolgender 5-HT-Freisetzung oder auch von Mastzelldegenerationen (Hellstrand, Dahlgren & Hermodsson, 1993). Weiterhin ist bekannt, dass Serotonin die Gefäßpermeabilität erhöht und so im Rahmen der Chemotaxis die Diapedese der Entzündungszellen erleichtern könnte (Hellstrand & Hermodson, 1987).

Die Wirkung von 5-HT auf die Zellen des Immunsystems wird über spezifische Rezeptoren auf den Membranoberflächen der Zellen vermittelt. Einzelheiten dazu im folgenden Kapiteln 2.1.5.

Ein vermuteter vermittelnden Effekt zwischen 5-HT und den Immunzellen über Cortisol konnte insofern nicht bestätigt werden, als bei Tieren, deren NNR entfernt worden war, Serotonin weiterhin immunsuppressiv wirkte (Jackson et al., 1995). Auf der anderen Seite konnte der immunhemmende 5-HT-Einfluss aufgehoben werden nach einer Hypophysektomie (Devoino, Morozova & Cheido, 1988). Dies spräche für die Beteiligung von hypophysären Hormonen (Prolaktin? ACTH?) an der Immunmodulation.

Hennig, Becker und Netter (1996) konnten wiederum in einer Untersuchung an gesunden Probanden feststellen, dass es nach einmaliger Gabe des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten Ipsapiron versus Placebo zu einem signifikantem Abfall der CD4<sup>+</sup>-Zellen kam. Gleichzeitig korrelierte dieser Abfall mit einem ipsapironinduzierten Anstieg von Cortisol.

Die Frage, ob Serotonin seine Einflüsse auf das Immunsystem auf direktem Weg (=Rezeptorebene) (Fillion et al., 1993; Fillion et al., 1989) oder über indirekte Mechanismen (Devoino, Morozova & Cheido, 1988) zur Geltung bringt, wird kontrovers diskutiert. Diese Verflechtung wird insbesondere bei der Serotoninstimulation durch dex-Fenfluramin interessant, da es hier neben einem 5-HT-Anstieg gleichzeitig zu einer Änderung von hypophysären Hormonen (z.B. Prolaktin, ACTH) kommt, die ihrerseits wiederum einen Einfluss auf das Immunsystem ausüben können (s. auch Kapitel 2.3). Hellstrand et al. (1993) gehen davon aus, dass Serotonin seine immunregulatorischen Effekte eher auf lokaler Ebene ausspielt als auf der systemischen, da hier die erreichten Konzentrationen zu gering wären.

Wie bereits erwähnt, muß man bei der Betrachtung des Einflusses von 5-HT auf das Immunsystem zwischen den einzelnen Komponenten/Zellen differenzieren, da eine einheitliche Aussage nicht möglich ist.

**2.1.5.2 Serotonerge Wirkungen auf das zelluläre Immunsystem**

Damit Serotonin seinen Einfluss auf das IS auszuüben vermag, sind 5-HT-Rezeptoren auf Immunzellen die Voraussetzung. Deshalb soll die folgende Tabelle 4 einen kurzen Überblick über die verschiedenen Rezeptorsubtypen und Komponenten auf einigen Zellen des IS geben:

**Tabelle 4:** Komponenten des serotonergen Systems, deren Einfluss sich in den Immunzellen nachweisen lässt. Die Rezeptoren auf den Zellen wurden entweder pharmakologisch oder durch die Anwesenheit von m-RNA (Northern blot, PCR) nachgewiesen. (Mossner & Lesch, 1998).

“+“ = vorhanden

	B-Zellen	T-Zellen	Monozyten / Makrophagen
5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptoren	+	+ <sup>1</sup>	+
5-HT <sub>2</sub> -Rezeptoren	+	+	+
5-HT <sub>3</sub> -Rezeptoren	+	+	
5-HT <sub>7</sub> -Rezeptoren	+		
5-HT-Synthese		+	(+) <sup>2</sup>
5-HT-Transporter	+		+

<sup>1)</sup> nur T-Zellen in aktiviertem Zustand;

<sup>2)</sup> humane Mastzellen enthalten kein 5-HT

Im Folgenden soll nun etwas genauer auf die einzelnen Zelltypen eingegangen werden.

- Eine Arbeitsgruppe (Khan, Bhardwaj, Malla, Wattal & Agarwal, 1986) konnte einen dosisabhängigen, hemmenden Einfluss von Serotonin auf die Proliferation mitogen-induzierter **T-Lymphozyten** in vitro feststellen. Aune et al. (1994) und Young et al. (1993) konnten jedoch im Gegensatz dazu diese Ergebnisse nicht bestätigen. Sie zeigten, dass die T-Zellproliferation mittels IL-2 durch die Gabe von 5-HT<sub>1A</sub>- bzw. 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten gehemmt werden kann. Ebenso konnte eine Hemmung erzielt werden durch eine Verminderung des 5-HT-Spiegels durch Applikation des Serotoninsynthesehemmer PCPA. Bei einer zusätzlichen Gabe von 5-HT zu IL-2 konnte sie eine Stimulation der Proliferation erreicht werden (Young, Kut, Wright, Young & Matthews, 1993). Aune et al. (1993) verwiesen darauf, dass erst nach einer Aktivierung humaner T-Lymphozyten diese 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren exprimieren. Die obigen Unstimmigkeiten in den Ergebnissen in Bezug auf die T-Zell-Proliferation lassen sich vielleicht durch unterschiedliche Konzentrationen des verwendeten 5-HT erklären. Die Proliferation der Lymphozyten nach einem Immunstimulanz (z.B. Con-A) wurde in der o.g. und anderen Untersuchungen jeweils bei sehr hohen 5-HT Konzentrationen gehemmt. Diese lagen weit über dem physiologischen Spiegel. Jedenfalls hat Serotonin einen modulierenden Effekt auf insbesondere durch IL-2 stimulierte T-Zellen durch Vermittlung des 5-HT<sub>1A</sub>- und eines 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptors (Aune, McGrath, Sarr, Bombara & Kelley, 1993; Mossner & Lesch, 1998) oder aufgrund zusätzlicher, noch nicht näher untersuchter, 5-HT-Rezeptoren. Einen interessanten Aspekt stellt noch die Hemmung der Produktion von TH1-typischen Zytokinen (s. dazu Kap. 2.3.2.1) von T-Gedächtniszellen durch 5-HT<sub>1A</sub>-Antagonisten dar (Aune, McGrath, Sarr, Bombara & Kelley, 1993).

Über die Auswirkungen von 5-HT auf **Granulozyten** ist nicht sehr viel bekannt. Clancy und Mitarbeiter (1993) zeigten eine verminderte Freisetzung chemotaktischer Faktoren nach Kontakt mit 5-HT und Nannmark et al. (1992 zit. n. (Mossner & Lesch, 1998) berichten von einem leichten Rückgang der Phagozytoseaktivität der Granulozyten unter physiologischen 5-HT-Konzentrationen.

- **Monozyten** (vom Menschen) unterdrücken durch Zellkontakt einige Funktionen der NK-Zellen (CD 16/56<sup>+</sup>) wie die IFN- $\gamma$  Produktion, deren Zytotoxizität, Proliferation und Expression der CD 16/56 Antigene. Hellstrand & Hermodson (1993) konnten zeigen, dass die Zugabe von 5-HT diese Suppression über die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren aufhebt. Ein 5-HT Mangel hat einen Verlust der Fähigkeit von Makrophagen zur Folge, T-Zellen (CD4<sup>+</sup>) zu aktivieren. In diesem Fall ist der 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptor verantwortlich. (Mossner & Lesch, 1998). Auf eine verminderte TNF- $\alpha$  Produktion der Monozyten durch 5-HT wird von einer anderen Arbeitsgruppe hingewiesen (Clancy, Fillion, Hellstrand & Lorens, 1993).

Die Effekte von 5-HT auf die Aktivität der **Makrophagen** sind eher widersprüchlicher Art in Bezug auf MHC-Präsentation und -Phagozytose. Insgesamt kann man aber

eher von einer gesteigerten Aktivität der Makrophagen (Superoxidproduktion, IFN- $\gamma$  induzierte Phagozytose) durch 5-HT ausgehen (Mossner & Lesch, 1998).

- Serotonin oder 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten (z.B. Ipsapiron oder 8-OH-DPAT) können die Zytotoxizität der **NK-Zellen** (CD16<sup>+</sup> und CD56<sup>+</sup>-Zelltyp) erhöhen. Diese sind verantwortlich für die Zerstörung verschiedener Zellen wie Tumor- oder virus-infizierte Zellen. Jedoch ist dieser Vorgang, im Gegensatz zur Aktivierung durch IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  oder IL-2, von der Monozytenanwesenheit abhängig (Hellstrand & Hermodsson, 1993). Die serotonerge Stimulation der Zytotoxizität und die Proliferation der NK-Zellen, kann bei Anwesenheit anderer Zytokine (IFN, IL-2) in vivo und in vitro noch geboostert werden (Rees, 1990, zit. n. Hellstrand, Dahlgren & Hermodsson, 1993). Hellstrand et al. (1987) konnten zeigen, dass es dabei vermutlich um eine selektive 5-HT<sub>1A</sub>-Reaktion handelt. Denn bei gleichzeitiger Verwendung von spezifischen Antagonisten konnte weder der 5-HT<sub>2</sub>-Antagonist Ketanserin noch der 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten Ondansetron die Reaktion verhindern, während der 5-HT<sub>1</sub> /5-HT<sub>2</sub>-Antagonist Cyproheptadin die Reaktion komplett zum Erliegen brachte (Hellstrand, Dahlgren & Hermodsson, 1993).

Die serotonergen Effekte auf die **B-Zell**-Stimulation sind äußerst widersprüchlich und reichen von einer gesteigerten, gar keiner bis zur supprimierten Antikörperantwort (IgM, IgG) auf Schaferythrozyten (SRBC) (Mossner & Lesch, 1998). Auf diesem Gebiet wird noch mehr Arbeit nötig sein, bevor man genauere Aussagen diesbezüglich treffen kann.

## 2.1.6 Die serotonerg vermittelte PRL-Stimulation

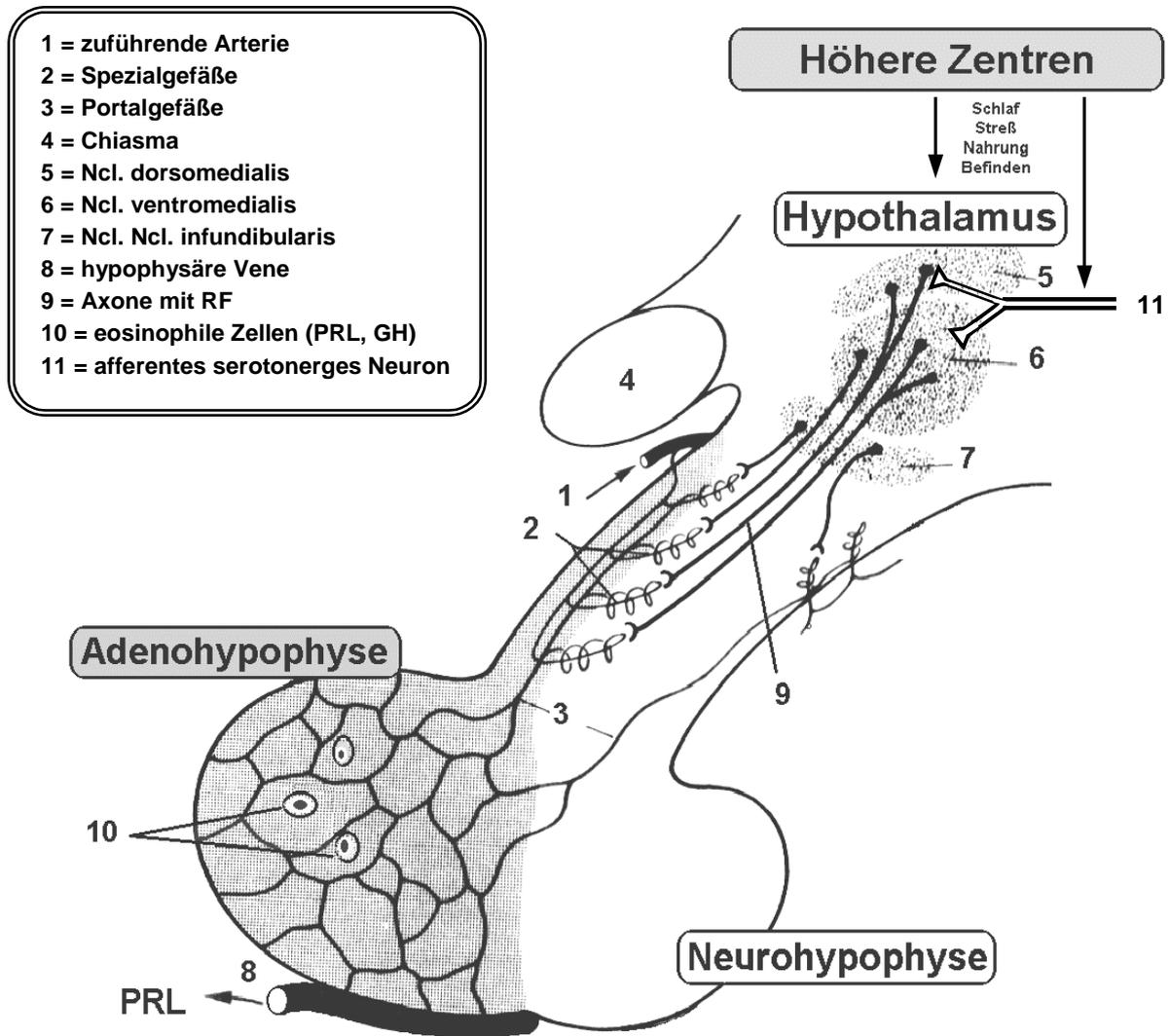
### 2.1.6.1 Anatomische und physiologische Grundlagen

Die primäre Regulation der Prolaktinsekretion geht von Dopaminneuronen im Hypothalamus aus (s. Kapitel 2.2.2.1). Von dort gelangt Dopamin über den hypothalamischen Portalkreislauf zur Adenohypophyse und führt zur tonischen Inhibition an den eosinophilen, prolaktinspeichernden Zellen. Hier soll nun die Wirkung, die Serotonin auf Prolaktin (PRL) ausübt, näher erläutert werden.

Serotoninerge Neurone beeinflussen die Sekretion einer Vielzahl von Hormonen, zu denen u.a. ACTH (und damit Cortisol), GH (fraglich nach Cowen, Anderson & Gartside, 1993), TRH, GnRH und Prolaktin aus der Adenohypophyse, Oxytozin und Vasopressin aus der Neurohypophyse, sowie auch Renin aus den Nieren gehören (Levey et al., 1994 und Van de Kar, 1993 beide zit.n. Van de Kar, Rittenhouse, Li & Levey, 1996; Levy & Van de Kar, 1992).

Wie bereits im Kapitel 2.1.1.1 dargestellt, strahlen Axone der serotonergen Neurone aus den dorsalen Raphe-Kernen auch in den Hypothalamus ein. Von dort erfolgt die Stimulation der eosinophilen Hypophysenvorderlappenzellen durch den

hypothalamisch-hypophysären Portalkreislauf, die daraufhin gespeichertes PRL ausschütten können. Abbildung 8 zeigt schematisch die anatomischen Verhältnisse.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der anatomischen Verhältnisse, die zur PRL-Freisetzung führen. Releasing-Faktoren (RF) werden in den Axonendigungen von hypothalamischer Neurone in die Spezialgefäße des hypothalamisch-hypophysären Portalkreislaufs freigesetzt und erreichen so über die Portalgefäße das hypophysäre Kapillargeflecht der Adenohypophyse (= Hypophysenvorderlappen). Hier bewirken RF (s. hierzu Kapitel 2.2.2) eine Sekretion von PRL (u.a.) aus den eosinophilen Zellen (modifiziert nach Kahle, 1986, p. 191).

Im Hypothalamus sind Neurone des Ncl. paraventricularis an der Vermittlung der serotonergen PRL-Stimulation beteiligt. Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Zerstörung dieser Neurone den PRL-Anstieg durch 5-HT-Releaser reduzieren (Van

de Kar, Rittenhouse, Li & Levey, 1996). Werden die serotonergen Neurone im Raphe-Kern selbst zerstört, unterbleibt der Plasma-PRL-Anstieg nach Injektion von Serotoninreleasern oder auch nach dem Stillen (Bartovsky et al., 1983 und Van de Kar et al., 1982, beide zit.n. (Van de Kar, Rittenhouse, Li & Levey, 1996). Eine verminderte PRL-Antwort konnte auch nach Gabe von verschiedenen 5-HT-Antagonisten beim Stillen am Menschen (Crosignani et al., 1979) bzw. nach Zufuhr des Serotoninsynthesehemmers PCPA am Säugetier (Bartovsky et al., 1983, zit.n. Van de Kar et al., 1996) festgestellt werden. Dies demonstriert die Beteiligung der beiden anatomischen Strukturen am PRL-Anstieg; ob dieser aber direkt auf den Neurotransmitter 5-HT zurückzuführen ist und/oder indirekt z.B. über Dopamin oder Neuropeptide vermittelt wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Für letzteres spricht beispielsweise eine Untersuchung von Chioccio et al. (1991, zit.n. Van de Kar et al., 1996), in der ein signifikanter hypothalamischer VIP-Anstieg begleitend zum PRL-Anstieg gemessen werden konnte. Ein PRL-Anstieg könnte somit nach Ohta et al. (1985) auch VIP-vermittelt sein.

#### **2.1.6.2 Die 5-HT-Rezeptor-vermittelte Prolaktinsekretion**

In den letzten Jahren wurden sehr viele Untersuchungen gemacht, um die Frage zu klären, welcher oder welche Serotoninrezeptor(sub)typen an der Vermittlung der PRL-Freisetzung beteiligt sind. Die Ergebnisse sind zum Teil widersprüchlicher Art und sollen im Folgenden genauer dargestellt werden. Bei diesen Untersuchungen fanden sowohl Serotoninvorstufen wie Tryptophan (TRP) und 5-Hydroxytryptophan (5-HTP), als auch verschiedene Rezeptor-Agonisten, wie m-CPP (5-HT<sub>1A/2C</sub> u. schwacher DA-Agonist), Buspiron (5-HT<sub>1A</sub>, DA<sub>2</sub>-Antagonist), MK-212 (5-HT<sub>1A</sub> / 5-HT<sub>2A/2C</sub>-Agonist), Ipsapiron (5-HT<sub>1A</sub>-Agonist) und indirekt wirkende Substanzen wie dex-Fenfluramin (s. Kapitel 3.2) Verwendung (Meltzer, 1993). Unter allen Substanzen konnte ein Anstieg von PRL im Serum erreicht werden (Yatham & Steiner, 1993). Unter Berücksichtigung der in Frage kommenden Rezeptoren - 5-HT<sub>1/2/3</sub> - lassen sich aus der Literatur folgende Aussagen in Bezug auf die Rezeptorsubtypen extrahieren - wobei selbstverständlich auch bisher nicht identifizierte 5-HT-Rezeptoren eine Rolle spielen könnten:

**5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor:** Lesch et al. (1989) konnten zeigen, dass der 5-HT<sub>1A</sub>-Agonist Ipsapiron beim Menschen keinen Anstieg des Serumprolaktins hervorrufen konnte. Im Gegensatz zu diesem Ergebnis steht eine Studie von Palazidou et al. (1995). Sie untersuchten die Wirkung von dex-Fenfluramin, einem Serotoninreleaser, an mit Pindolol (5-HT<sub>1A</sub>-Antagonist) vorbehandelten Patienten. Entgegen den Ergebnissen von Lesch, die gegen eine Beteiligung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors sprechen, konnten Palazidou et al. jedoch eine Hemmung der Serotoninsekretion durch Pindolol nachweisen. Meltzer et al. (1992) konnten an Probanden keinen Effekt auf einen Buspiron-indu-

zierten PRL-Anstieg durch Pindololhemmung nachweisen. Zu diesem Ergebnis kamen auch Coccaro et al. (1992). Eine Buspiron-induzierte PRL-Sekretion wird von Metzler et al. (1993) deshalb auf dessen dopaminantagonistische ( $DA_2$ ) Wirkung und nicht auf die  $5-HT_{1A}$ -Rezeptor-agonistische Komponente zurückgeführt.

**5-HT<sub>2A/2C</sub>-Rezeptor:** In Bezug auf die  $5-HT_2$ -Rezeptorenvermittelte PRL-Stimulation herrscht in der Literatur weitgehende Einigkeit. Die Injektion (i.v. oder i.c.v.) des  $5-HT_{2A/2C}$ -Rezeptor-Agonisten DOI ruft einen PRL-Anstieg hervor (Van de Kar et al., 1996). Gibt man indirekt wirkendes dex-Fenfluramin oder den unspezifischen  $5-HT$ -Rezeptor-Agonisten MK-212 kann eine Prolaktinsekretion jeweils durch die spezifischen  $5-HT_{2A(2C)}$ -Antagonisten Ketanserin oder Ritanserin verhindert werden (Van de Kar et al., 1996; Coccaro, Kavoussi, Oakes, Cooper & Hauger, 1996).

**5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor:** Auch der  $5-HT_3$ -Rezeptor soll in der serotonerg vermittelten Prolaktinantwort eine Rolle spielen. Eine durch p-Chloramphetamin (i.p.) oder  $5-HT$  (i.v.) induzierte Freisetzung von Prolaktin kann durch die periphere Injektion von  $5-HT_3$ -Rezeptor-Antagonisten (Ondansetron, MDL 7222) geblockt werden. Wird jedoch das  $5-HT$  intracraniell (i.c.v.) appliziert, erfolgt keine Hemmung durch die  $5-HT_3$ -Antagonisten, was die Vermutung nahelegt, dass die prolaktinfreisetzenden  $5-HT_3$ -Rezeptoren peripher lokalisiert sind (Van de Kar et al., 1996).

**Rezeptor-Interaktionsthese:** Für eine notwendige Interaktion des  $5-HT_{1A}$ - und des  $5-HT_{2A/2C}$ -Rezeptors bei der Prolaktinfreisetzung sprechen die folgenden Untersuchungen: Eine Prolaktinstimulation durch MK-212 ( $5-HT_{1A}$ - u.  $5-HT_{2A/2C}$ -Agonist) (Meltzer & Maes, 1995a) konnte ebenso wie eine Stimulation mit m-CPP ( $5-HT_{1A}$ - u.  $5-HT_{2C}$ -Agonist) (Meltzer & Maes, 1995b) durch vorhergehende Pinololgabe ( $5-HT_{1A}$ -Antagonist) signifikant gehemmt werden. Auf der anderen Seite kann eine Prolaktinfreisetzung durch MK-212 oder dex-Fenfluramin ebenso gehemmt werden durch den Einsatz von Ritanserin oder Amesergid ( $5-HT_{2A/2C}$ -Antagonisten) (Meltzer, 1993; Van de Kar et al., 1996). Somit liegt der Schluss nahe, dass nur die Aktivierung des  $5-HT_{1A}$ - plus  $5-HT_2$ -Rezeptors eine Prolaktinfreisetzung ermöglicht, da eine Blockade jedes einzelnen Rezeptors zur Hemmung führt.

Diese Aspekte zusammenfassend lässt sich trotz widersprüchlicher Studienergebnisse sagen, dass eine  $5-HT_{1A}$ -Aktivierung alleine nicht ausreichend ist, aber in Kombination mit dem  $5-HT_{(2A)/2C}$ -Rezeptor notwendig sein kann. Beim  $5-HT_{(2A)/2C}$ -Rezeptor stehen Studien, die durch alleinige Agonistengabe eine Freisetzung erreichen konnten neben denen, bei denen nur die Gabe beider Rezeptor-Agonisten eine Stimulation erreichen konnten.  $5-HT_3$ -Rezeptoren können scheinbar in der Peripherie eine PRL-Stimulation bewirken.

Die Prolaktinstimulation des Serotoninreleasers und Reuptakeinhibitors dex-Fenfluramin lässt sich somit durch o.g. Mechanismen erklären. Die Stimulierbarkeit wurde bisher in einigen Studien gezeigt, wobei regelmäßig neben der PRL-Erhöhung auch eine Zunahme des Serumcortisols erfolgte. Die Aspekte des Cortisolanstiegs und dessen Auswirkungen werden in dieser Arbeit noch im Kapitel 5.2 diskutiert, bzw. soll eine Anschlussstudie weitere Aspekte näher beleuchten.

## 2.2 Das Peptidhormon Prolaktin

### 2.2.1 Geschichte, Aufbau und Physiologie

Prolaktin wurde erstmals 1928 in Tieren als ein Hormon des Hypophysenvorderlappens entdeckt und 1932 von Riddle, Bates, Dykshorn und Braucher genauer charakterisiert und als solches benannt (Clevenger, Freier & Kline, 1998). Aber erst 1971 konnte humanes PRL (h-PRL) als eigenständiges, und von GH verschiedenes Hormon, dargestellt werden (Thorner, Vance, Horvath & Kovacs, 1992). Die Gene für hPRL und hGH wurden in den frühen 80er Jahren isoliert, sequenziert und als Mitglieder der selben Familie erkannt und definiert (Thorner, 1992).

Zu Beginn sah man die Funktion des Hormons nur in der Aufgabe die Milchproduktion Schwangerer in Gang zu setzen und diese aufrechtzuerhalten. Nach und nach erkannte man aber die multifunktionelle Potenz dieses Hormons, das an der Steuerung von Fortpflanzung, Osmoregulation, Verhalten, Immunmodulation und vielen weiteren biologischen Funktionen beteiligt ist (Clevenger, Freier & Kline, 1998).

Aufgrund gleicher Aminosäuresequenzen und Position der Disulfidbrücken sind Prolaktin, humanes GH, Erythropoetin, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) und die Interleukine IL-2 bis IL-7 miteinander in der Zytokin/Hämatopoetin-Familie verwandt (Clevenger, Freier & Kline, 1998; Bazan, 1990). Es wird angenommen, dass sie von einem gemeinsamen Ursprungsgen im Verlauf der Evolution der Vertebraten abstammen (Thorner et al., 1992). Das Gen, das Prolaktin kodiert, ist auf Chromosom 6 lokalisiert und besitzt eine Länge von mehr als 10 kb (Thorner et al., 1992).

Hauptbildungsort von PRL sind die laktotropen Zellen im Hypophysenvorderlappen (HVL), auch mammothrope oder luteotrope Zellen genannt. Der Anteil dieser Zellen schwankt von 10% - 30% bei Männern und kann bei Multiparae von 40% bis zu 45% je nach Literatur betragen (Thorner et al., 1992; Nira, 1994). Im Durchschnitt enthält die normale Hypophyse eines erwachsenen Menschen 100 µg PRL, 50-100 mal weniger als beispielsweise der Gehalt an GH (Thorner et al., 1992). Die Produktion von PRL beträgt pro Tag 200 µg, die metabolische Clearance rate wird von Thorner M.O. et al. (1992) mit 45ml/min/m<sup>2</sup>, die Halbwertszeit der monomeren Form mit 20 min angegeben.

Die Angaben über die exakten Referenzwerte von Prolaktin im Serum für Männer sind nicht einfach zu eruieren und variieren teilweise deutlich voneinander oder sind nur an kleinen Kollektiven bestimmt worden. Die durchschnittliche Serumkonzentration von PRL wurde in einer Arbeit von Kleinberger et al. (1977) anhand von 102 ge-

sunden, nicht krankenhausstationären Männern und Frauen im Alter von 18 bis 67 Jahren untersucht. Dabei ergab sich ein signifikanter Geschlechtsunterschied wobei die durchschnittliche Serumkonzentration bei Männern bei  $4,7 \pm 2,82$  ng/ml lag und der Wert bei Frauen  $8,00 \pm 4,69$  ng/ml betrug. Werte größer als 15 ng/ml bei Männern und größer als 20 ng/ml bei Frauen gelten danach als pathologisch. In neueren Tabellen werden Werte für erwachsene Männer von  $5 \pm 3$  ng/ml ( $M \pm SD$ ) bzw.  $5,2 \pm 0,5$  ng/ml und einem Bereich von 1,2-12 ng/ml angegeben (Sitzmann, 1986). Ammer et al. (1985) geben keinen Mittelwert sondern die Grenzwerte mit 0,68 – 10,68 ng/ml an die mit der RIA-Methode bestimmt wurden.

Humanes Prolaktin besteht aus einer 198 Aminosäuren langen Kette, die durch drei Disulfidbrücken ihre dreidimensionale Form, also ihre Tertiärstruktur, erhält.

Im Blut zirkulierendes PRL kommt in drei verschiedenen Formen vor. Die häufigste Version ist mit 85% die monomere mit einem Molekulargewicht von 23,5 kD, die sog. „little“ oder „native“ Form. Daneben gibt es mit einer Häufigkeit von etwa 8% eine dimere Form, das „big“ PRL, mit einem Molekulargewicht zwischen 48 und 56 kD und als dritte Version existiert zu 1%-8% eine polymere Form, das „big-big“ Prolaktin mit einem Gewicht von mehr als 100 kD (Thorner et al., 1992; Katznelson & Klibanski, 1995; Matera, 1997). Die biologische Bedeutung der unterschiedlichen Formen ist noch nicht restlos aufgeklärt, wobei die monomere Form die wichtigste darstellt und die höchste Rezeptoraffinität besitzt (Katznelson & Klibanski, 1995). Während der Schwangerschaft kommt es in der Hypophyse zu einer Zunahme der laktotropen Zellen sowie deren Gehalt an PRL. Hier konnte besonders ein Anstieg des „big“-PRL beobachtet werden (Frantz, 1978).

Der größte Teil des zirkulierenden PRL liegt in nichtglykosilierter Form vor, aber es wurden auch glykosilierte und phosphorilierte Formen beschrieben, deren Bedeutung bisher nur Spekulationen vorbehalten ist (Nira, 1994). Nach Sinha et al. (1991) liegt PRL in der menschlichen Hypophyse zu 10%-15% glykosiliert vor, wobei diese Modifikation die biologische Aktivität zu beeinflussen scheint (Sinha, 1991).

Der Nachweis von PRL im Serum erfolgt heutzutage standartmäßig mit dem Radioimmunassay-Verfahren (RIA) mit dem man unter guten Bedingungen eine Sensitivität von 1-2 ng PRL/ml Serum erreichen kann. Die Messungen mit dem Radioimmunassay korrelieren sehr gut mit denen aus Bioassays derselben Species, sodass man sagen kann, dass immunologisch gemessenes PRL auch tatsächlich der Menge an biologisch aktivem Hormon entspricht.

## 2.2.2 Regulation der Sekretion

Prolaktin zählt zu den sog. nicht-glandotropen Hormonen und besitzt somit kein spezifisches Zielorgan im Organismus. Seine Wirkung und seine Einflüsse sind vielfältiger Art und werden im Folgenden noch genauer beleuchtet. Die Regulation von PRL unterliegt somit auch nicht nur einem einfachen Feedback-Mechanismus wie es beispielsweise bei den schilddrüsenregulierenden Hormonen  $TRH \leftrightarrow TSH \leftrightarrow T_3/T_4$  der Fall ist. Die Sekretion, bzw. die Inhibition der Sekretion, unterliegt vielmehr einer Vielzahl an endogenen Hormonen, Zytokinen und Neurotransmittern, welche wiederum Antworten auf diverse Umwelteinflüsse darstellen können sowie der Tageszeit, der Zyklusphase und dem Lebensalter. Neben dieser endokrinen Art der Regulation spielen auch die parakrine und die autokrine Regulation innerhalb der Hypophyse eine wichtige Rolle.

Unterschiedliche Subpopulationen laktotroper Zellen im HVL besitzen unterschiedliche Membranpotentiale und haben so teilweise die Fähigkeit zur Spontandepolarisation (Israel, Kukstas & Vincent, 1990), was sich in einem gewissen Mindestspiegel an Serum PRL auswirkt, unabhängig von Stimulation bzw. Inhibition der laktotropen Zellen.

### 2.2.2.1 Regulation durch hemmende und stimulierende endogene Faktoren auf hypophysäres PRL

Die PRL-Sekretion weist ein gewisses konstantes spontanes Niveau auf und wird im Wesentlichen durch die tonische Hemmung von Dopamin, in diesem Zusammenhang auch als Prolaktin-Inhibitionsfaktor (PIF) bekannt, reguliert (Ferrari, 1981). Viele andere Hormone, Neurotransmitter und Zytokine haben ebenfalls Einfluss auf den PRL-Gehalten im Serum und sollen in folgender Übersicht dargestellt werden (Tabelle 5):

**Tabelle 5:** Einflüsse von verschiedenen Hormonen, Peptiden, Zytokinen und Neurotransmittern auf die PRL-Sekretion. (PRL  $\uparrow$  = Anstieg; PRL  $\downarrow$  = Abfall)  
(Zusammengestellt nach: Bernton, Bryant & Holaday, 1991, Katznelson & Klibanski, 1995; 1991; Masumoto & Kasahara, 1991; Matera, 1997; Koike, Nira, 1994; Weigent, Buckingham & Gilies 1996)

PRL ↑	PRL ↓
β-Endorphin	Acetylcholin
Angiotensin II	Activin
Endogene Opiode	Calcitonin
GABA	Chloroquin
Galanin	Dopamin
IL-2 , IL-6 <sup>1</sup>	Endothelin 1 u. 3
Östrogen	Endotoxin
Oxytocin	Glucocorticoide
Serotonin (5-HT)	IL-1 <sup>2</sup>
Substanz P	Interferon-γ
TNF-α <sup>3</sup>	PRL (Feedback-Mechanismus)
TRH	TNF-α <sup>3</sup>
VIP	

<sup>1</sup> (in Weigent et al., (1996) kein Effekt)

<sup>2</sup> (in Weigent et al., (1996) Gegenteil)

<sup>3</sup> sowohl hemmender als auch stimulierender Effekt möglich, s. Text

- Direkt und indirekt PRL hemmende Substanzen

Die tonische Inhibition von PRL durch Dopamin wird über tuberoinfundibuläre dopaminerge Neurone erreicht, die durch eine Freisetzung von Dopamin eine Stimulation der DA-2 Rezeptoren auf der Zellmembran der laktotropen Zellen bewirken. Das Dopamin das aus den Nervenenden der tuberoinfundibulären Neurone freigesetzt wird, gelangt in das hypophysäre Portalvenensystem und erreicht so die laktotropen Zielzellen im HVL (Nira, 1994). Intrazellulär kommt es zu einer Hemmung der Adenylatzyklase, dies führt wiederum zu einer Verringerung an zyklischem AMP, was mit einer Hyperpolarisation der Zelle einhergeht und über eine Hemmung der kalzium-abhängigen Aktionspotentiale und einen verringerten intrazellulärem Kalziumspiegel zur Folge hat. Ca<sup>2+</sup> ist der wichtigste Second-Messenger in der Signalverarbeitung der laktotropen Zellen. Dies führt auf kurzfristigem Weg zu einer verringerten PRL-Sekretion (Katznelson & Klibanski, 1995; Weigent et al., 1996). Längerfristig kann Dopamin auch einen hemmenden Effekt auf die PRL-Genexpression ausüben (Thorner et al., 1992; Nira, 1994).

Hemmt man andererseits das dopaminerge System, beispielsweise mit dem Dopamin-Antagonisten Metoclopramid, so kann man einen prompten PRL-Anstieg durch Wegfall der Hemmung verzeichnen.

Ein erhöhter PRL-Spiegel bewirkt dann durch negative Rückkopplungsmechanismen eine Stimulation dopaminerger Neurone im Hypothalamus durch verstärkte Dopaminsynthese und Freisetzung (Nira, 1994). Es kommt somit wieder zu dem tonisch

inhibierenden Einfluss des Dopamins. Der genaue Weg der negativen Rückkopplung ist noch nicht vollständig erklärt, da zwar spezifische PRL-R im Hypothalamus nachgewiesen wurden, nicht jedoch auf den tuberoinfundibulären dopaminergen Neuronen (Chiu, Koos & Wise, 1992).

Das Immunzytokin Interleukin-1 (IL-1) inhibiert in vitro und in vivo die Prolaktinfreisetzung wie Bernton et al. (1991) beschreiben. Auf der anderen Seite berichten Schettini et al. (1990) (zit. n. Matera, 1997) von einer PRL-Freisetzung durch IL-1 aus dem HVL.

Eine weitere Substanz, die in der Literatur kontrovers diskutiert wird, ist TNF- $\alpha$ . So berichten Walton & Cronin (1990) von einer Hemmung der Freisetzung, während Koike Masumoto & Kasahara (1991) von einer verstärkten Freisetzung aus Zellen des HVL ausgehen. Endotoxin aus Bakterien bewirkt einen starken Anstieg von IL-1 und hat somit ebenfalls einen indirekten Einfluss auf PRL (Bernton, Bryant & Holaday, 1991). Diese Effekte werden allerdings noch genauer im Kapitel 2.3 „PRL und Immunsystem“ besprochen.

Endotheline, kleine Proteine, die als Vasokonstriktoren dienen, haben einen inhibitorischen Effekt auf die PRL-Sekretion, der nicht über D2-Rezeptoren vermittelt wird, sondern allem Anschein nach in die G-Protein vermittelte Signaltransduktion eingreift (Nira, 1994).

- Direkt und indirekt PRL-freisetzende Substanzen

Die PRL-freisetzende Wirkung biogener Amine, die als Neurotransmitter fungieren, wie Gamma-Amino-Buttersäure (GABA), ist letztendlich auch eine Folge des Einflusses auf tuberoinfundibuläre, dopaminerge Neurone und somit auf den Prolaktinspiegel (Bernton, Bryant & Holaday, 1991). Allerdings wurden auch GABA-Rezeptoren auf der Oberfläche der laktotropen Zellen entdeckt, was damit auch eine direkte Wirkung nahelegen könnte (Katznelson & Klibanski, 1995).

Die beiden hypophysären Neuropeptide TRH und VIP auch als Prolaktin-releasing-factors (PRF) bezeichnet, vermitteln ihren starken PRL-freisetzenden Effekt direkt auf die laktotropen Zellen des HVL, indem sie an spezifischen Plasmamembranrezeptoren binden und daraufhin über Phosphatidylinositol bzw. über zyklisches AMP ihre Wirkung entfalten (MacLeod, Scapagnini & Thorner, 1985). Für TRH-Rezeptoren auf den laktotropen Zellen konnte gezeigt werden, dass es mit zunehmender TRH-Konzentration zu einer Reduzierung der Zahl der Rezeptoren kommt, also zu einer Down-Regulation. TRH erhöht nicht nur die Freisetzung von PRL, sondern hat des-

weiteren auch einen stimulierenden Effekt auf die Gentranskription von PRL (Nira, 1994).

VIP soll seinen Einfluss auf die PRL-Freisetzung, wie Angiotensin II, Aktivin und PRL selbst, als parakrines und/oder autokrines Agens ausüben (Thorner et al., 1992; Nira, 1994).

Parakrine Regulation bedeutet die Beeinflussung einer Zelle durch eine Nachbarzelle, die regulierende Substanzen freisetzt, welche auf dem Weg der Diffusion und nicht über den Blutweg die Zelle erreichen. Bei der autokrinen Regulation werden in der Zelle selbst regulierend wirkende Stoffe gebildet.

Auf den PRL stimulierend wirkende Effekt von IL-6 wird an anderer Stelle noch genauer eingegangen.

Östrogene sind wichtige physiologische Stimulatoren der PRL-Freisetzung. Sie wirken einerseits direkt auf laktotrope Zellen durch eine verstärkte Biosynthese von PRL (ein ständig erhöhter Östrogenspiegel, wie er während der Schwangerschaft vorkommt, führt zu einer Zunahme der Zahl und Größe der laktotropen Zellen); andererseits vermögen Östrogene den PRL-Spiegel auch indirekt zu erhöhen durch einen dämpfenden Einfluss auf den dopaminergen Tonus (Katznelson & Klibanski, 1995).

Der stimulierende Einfluss von Serotonin (5-HT) wurde bereits ausführlich im Kapitel 2.1.6 dargestellt.

Endogene Opiode, Enkephaline und  $\beta$ -Endorphin sind in hohen Konzentrationen im Hypothalamus und der Eminentia mediana zu finden. Sie besitzen einen in vivo- und in vitro-Effekt auf die PRL-Stimulation und können durch den Opiatrezeptorantagonisten Naloxon in ihrer Wirkung gehemmt werden. Die Wirkung erfolgt nicht direkt, sondern durch Aktivitätsminderung der tuberoinfundibulären dopaminergen Neurone. Dadurch kommt es zu einer Minderung des tonisch inhibierenden Effekts auf die laktotropen Zellen und die PRL-Freisetzung steigt.

#### **2.2.2.2 Pharmakologische Einflüsse auf den Prolaktinspiegel**

Einen Überblick über die pharmakologischen Substanzen, die einen Einfluss auf die Höhe des PRL-Spiegels nehmen, gibt Tabelle 6:

**Tabelle 6:** Pharmakologische Einflüsse auf den Prolaktinspiegel (PRL ↑ = Prolaktinanstieg; PRL ↓ = Prolaktinabfall); zusammengestellt n.: Bernton, Bryant & Holaday, 1991; DeGroot, Cahill & Odell, 1979; Katznelson & Klibanski, 1995

PRL ↑	PRL ↓
Anticholinergika (z.B. Atropin)	Acetylcholinesteraseinhibitoren (z.B. Physostigmin)
Dopaminrezeptorantagonisten (z.B. MCP, Neuroleptika [Haloperidol, Phenothiazine])	Dopamin-Agonisten (z.B. Bromocriptin)
H <sub>2</sub> -Blocker (z.B. Cimetidin)	Dopamin, L-Dopa
Insulin	langwirksame Opiate
Kalziumkanalblocker	Opiatantagonisten (z.B. Naloxon)
kurzfristig wirkende Opiate (z.B. Morphin)	
Östrogenpräparate	
Serotonin-Releaser (dex-Fenfluramin)	
Trizyklische Antidepressiva (z.B. Imipramin, Amitryptilin)	

Dopamin-2-Rezeptor-Agonisten wie Bromocriptin (BCR) imitieren einen Dopaminanstieg und verringern so den Serum-Prolaktinspiegel, was bereits unter dem vorher Besprochenen näher erläutert wurde. Neuroleptika, also Dopamin-2-Rezeptorblocker (z.B. Chlorpromazin, Haloperidol), führen zu einem Anstieg von PRL, da sie die tonische Hemmung der laktotropen Zellen durch Dopamin aufheben (Bernton, Bryant & Holaday, 1991). Über den gleichen Mechanismus lässt sich der PRL-Anstieg nach Applikation von MCP erklären.

Naloxon als Opioidantagonist und endogene Opioid Peptide sowie exogen zugeführte Opiate vermitteln ihre Wirkung in Bezug auf PRL über  $\mu$ - und  $\kappa$ -Opioid-Rezeptoren, die auf den tuberoinfundibulären dopaminergen Neuronen sitzen (Holaday, Gilbeau, Smith & Pennington, 1984). Dadurch wird über eine Hemmung der dopaminergen Neurone durch Opioid-Agonisten die tonische Hemmung auf die PRL-Freisetzung gesenkt. Auf der anderen Seite haben die Opioidantagonisten den gegenteiligen Effekt (Holaday et al., 1984).

### 2.2.2.3 Umwelteinflüsse auf die PRL-Sekretion

- Tageszeit

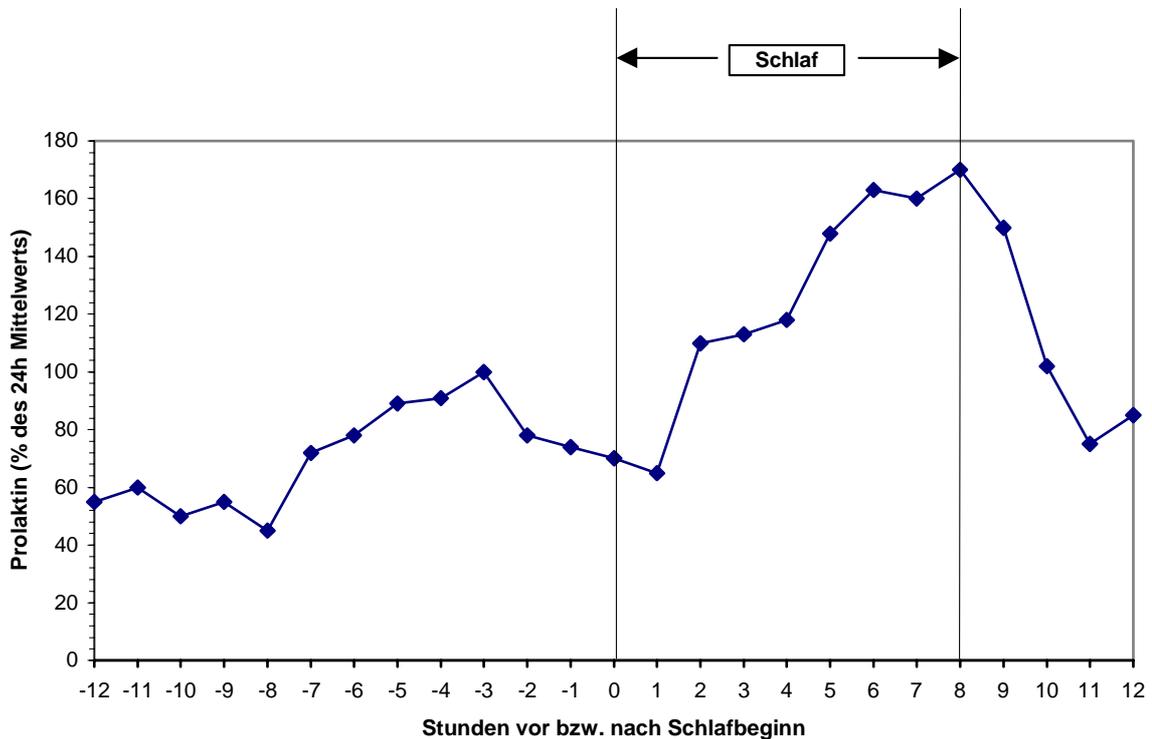
Eine deutliche Schwankung im PRL-Serumspiegel erkennt man im zirkadianen Verlauf. Die niedrigsten PRL-Spiegel werden in der Regel am späten Vormittag bis Mittag gemessen (Thorner et al., 1992). Während des Schlafes kommt es zu einem starken Anstieg von PRL. 60 bis 90 Minuten nach dem Einschlafen steigt die Serumkonzentration um bis zum fünffachen der Spiegel von Werten, die untertags gemessen werden können (Sassin, Frantz & Weitzmann, 1972). Auch während des Schlafes bleibt der hohe PRL-Spiegel erhalten, ist jedoch einigen Schwankungen unterworfen, die im Zusammenhang mit den REM und non-REM Schlafphasen stehen.

Ein Nickerchen unter Tags kann zu einem PRL Zuwachs im Serum führen, während der Anstieg ausbleibt, wenn man eine Testperson Nachts wach hält.

Die Sekretion erfolgt episodisch in einem bestimmten Muster. So wurden bei gesunden Männern eine PRL-Sekretion in etwa 14 Pulswellen pro Tag mit einem Abstand von durchschnittlich 95 min festgestellt. Der nächtliche Anstieg ist dabei eher auf eine erhöhte Pulsamplitude als auf eine erhöhte Frequenz zurückzuführen (Frantz, 1978).

Die folgende Abbildung 9 soll beispielhaft den zirkadianen Rhythmus veranschaulichen. Die Daten geben die Ergebnisse einer Studie von Sassin et al. (1972) wieder. Andere Untersuchungen, wie beispielsweise Arafath et al. (1992), kommen prinzipiell zu gleichen Ergebnissen, nämlich dem starken nächtlichen Anstieg, dem starken PRL-Abfall am Morgen, postprandialen Anstiegen und einer tendentiellen Abnahme am Nachmittag.

Die Verläufe können tagsüber jedoch interindividuellen Schwankungen unterliegen und so in gewissem Maße voneinander abweichen. Der klassische zirkadiane Verlauf wie er beispielsweise für die Cortisolsekretion gegeben ist, tritt beim PRL aufgrund der größeren Variabilität nicht in dieser Deutlichkeit zu Tage. Siehe dazu auch die folgende Abbildung 9:



**Abbildung 9:** Durchschnittliche Prolaktinkonzentrationen im Serum 6 gesunder Probanden (3 weibliche, 3 männliche) gemessen über ein 24 Stunden Intervall. Die Blutentnahmen erfolgten über einen Venenverweilkatheter im Abstand von 20 min; der Übersicht wegen sind nur die stündlichen Werte dargestellt. Zeitangabe in Stunden bezogen auf den Schlafbeginn. Schlaf gemessen im EEG. (Modifiziert nach Sassin, Frantz & Weitzmann, p. 1205).

- Lebensalter und Geschlecht

Bis zur Pubertät besteht kein Unterschied im Serum PRL-Spiegel zwischen Jungen und Mädchen. Während der Pubertät kommt es dann bei Mädchen, neben einem Anstieg von Östrogen, zu einem signifikanten Ansteigen der Serumspiegel von PRL auf den Wert geschlechtsreifer Frauen (Ferrari, 1981).

Der Serum-Prolaktinspiegel ist bei Frauen im gebärfähigen Alter grundsätzlich höher als bei gleichaltrigen Männern, was u.a. mit der Zahl der laktotropen Zellen, die bei Frauen 40%-45% und bei Männern nur 30%-35% der Zellzahlen im Hypophysenvorderlappen ausmachen, zusammenhängt (Nira, 1994). Nach der Menopause fallen die weiblichen PRL-Spiegel wieder auf die männlichen Werte ab (Ferrari, 1981).

- Stress

Sowohl psychischer als auch physischer Stress in Form von z.B. Sport oder operativen Eingriffen verändern das PRL im Serum. Akuter Stress führt zu einem Anstieg, während langandauernder Stress zu einem Abfall des Serumspiegels führt. Beide Effekte sind jeweils bei Frauen deutlicher ausgeprägt als bei Männern (Frantz, 1978).

Bereits das Legen einer Verweilkanüle kann den PRL-Spiegel von Probanden eindeutig verändern wie Moulton et al. (zit. n. Thorner & Evans, 1984) in einer randomisierten Untersuchung herausfanden. So war bei 74% der untersuchten Probanden die initial gemessene PRL-Konzentration im Vergleich zum Zwei-Stunden-Wert erhöht. Bei 44% der untersuchten mit primär erhöhten Werten fiel der Wert innerhalb der ersten zwei-Stunden wieder auf Normalwerte ab.

- Nahrungsaufnahme

Schnelle Anstiege von Serumprolaktin werden innerhalb einer Stunde nach einem Essen gemessen. Hauptverantwortlich dafür scheinen Aminosäuren zu sein, die von den Nahrungsproteinen abgespalten werden (Katznelson & Klibanski, 1995).

im Rahmen der Fortpflanzung:

- Geschlechtsverkehr

Beim Geschlechtsverkehr kommt es bei etwa einem Drittel der Frauen im gebärfähigen Alter zu einem Anstieg der PRL Serumkonzentration (Frantz, 1978). Dieser Anstieg ist unabhängig von der Manipulation der Brustwarzen. PRL ist das einzige Hypophysenhormon das beim Menschen durch Geschlechtsverkehr beeinflusst wird (Frantz, 1978).

- Schwangerschaft

Erstaunliche Anstiege von PRL um das 10-30 fache der Ausgangswerte sind im Verlauf einer Schwangerschaft zu messen (DeGroot, Cahill & Odell, 1979). In dieser Zeit kommt es zu einer Hyperplasie der hypophysären laktotropen Zellen, sodass sich die Größe der Hypophyse annähernd verdoppeln kann (Ferrari, 1981). Nach der Geburt des Kindes kommt es zu einem raschen Absinken des mittlerlichen PRL-Spiegels auf die Ausgangswerte, wie sie vor der Schwangerschaft geherrscht haben. Diese werden bei einer nicht stillenden Mutter innerhalb von 1-3 Wochen erreicht (Ferrari, 1981). Stillende Mütter haben einen noch länger anhaltenden erhöhten PRL Wert.

- Stillen und Manipulation der Brustwarzen

Diese länger anhaltend erhöhten PRL-Werte stillender Mütter werden über eine rezidivierende Stimulation der Brust durch den Säugling erreicht. Eine Manipulation der Brustwarzen durch Stillen provoziert bei der Mutter einen prompten Anstieg von PRL

der je nach Abstand zur Geburt das 10-20 fache betragen kann. Schon 15-30 Minuten nach Anlegen des Babies an die Brust, steigt der PRL-Spiegel und hält somit die Laktationsphase in Gang. Auch eine Stimulation der Brustwarzen bei nicht stillenden Frauen führt zu einem messbaren Anstieg an Serum PRL. Dieser Anstieg scheint unter anderem auch durch direkte neuronale Wege zustande zu kommen (Katznelson & Klibanski, 1995).

- **Menstruationzyklus**

Eine Änderung im Laufe des Menstruationszyklus von PRL ist nur in geringem Ausmaß vorhanden. So soll der Gipfel des Anstiegs in etwa in der Mitte des Zyklus liegen und mit dem LH Maximum zusammenfallen (Vekemans, Delvoye & L'Hermite, 1977). In anderen Studien konnte dies nicht bestätigt werden, was am ehesten damit zusammenhängt, dass die Amplituden nicht sehr groß sind und von anderen Faktoren überlagert werden können. Eine Studie von Netter und Hennig (1997) konnte zeigen, dass bei Frauen, die über das prämenstruelle Syndrom klagen, auch nach Elimination konfundierender Persönlichkeitsfaktoren ein prämenstruell erhöhter PRL-Spiegel gemessen werden kann.

#### **2.2.2.4 Zelluläre Mechanismen der PRL-Freisetzung**

Nach der Translation von PRL-m-RNA entsteht das sog. Präprolaktin, ein Protein mit einem höheren Molekulargewicht als PRL, das durch zusätzliche Aminosäuresequenzen entsteht. Die Synthese erfolgt an Polyribosomen, die an der äusseren Oberfläche des rauhen endoplasmatischen Retikulums gebunden sind. Die zusätzlichen Aminosäuresequenzen, die als Signalpeptide dienen, werden von Endopeptidasen, die an der inneren Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums sitzen, abgeschnitten. Die wachsende Aminosäurekette ist fähig, die Membran zu durchdringen und erhält dann ihre Tertiärstruktur. Das neu synthetisierte PRL-Molekül wird daraufhin zum Golgi-Apparat transportiert und dort zu kleinen, dicht gepackten sekretorischen Granula verpackt, die sich vom Golgi-Apparat lösen und im Zytoplasma zu größeren Granula kondensieren (Ferrari, 1981).

Die Freisetzung erfolgt dann durch Exozytose in den extrazellulären Raum. Dieser Vorgang erfolgt normalerweise an der Zellwandseite, an der eine Kapillare vorbeizieht, kann aber auch an anderen Stellen erfolgen. Die Freisetzung des PRL aus den Granula kann aber auch durch Fusion mit Lysosomen in den lysosomalen Raum erfolgen. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn die Aktivität der laktotropen Zellen mit einem Mal unterbrochen wird, wie es beim Abstillen der Fall ist (Zanini, Giannattasio & Meldolesi, 1979).

### **2.2.3 Biologische Funktionen und Einflüsse von PRL auf den Organismus**

Seit Entdeckung des Hypophysenhormons Prolaktin sind Berichte über die Anzahl seiner Funktionen im Organismus stetig angewachsen. Von seiner „klassischen“ Aufgabe der Stimulation der Milchproduktion in der Brustdrüse bis hin zu einer Funktion als Stresshormon reicht die Palette. Bereits in den 80er Jahren berichtet Nicoll (1980) von über 85 diversen Funktionen für PRL innerhalb der Familie der Vertebraten. Diese können wiederum in sieben Hauptkategorien unterteilt werden (Kelly, Djian, Postel-Vinay & Edery, 1991):

- (1) Reproduktion und Laktation;
- (2) Wasser- und Salzhaushalt;
- (3) Wachstum und Morphogenese;
- (4) Metabolismus;
- (5) Verhalten;
- (6) Einfluss auf Ektoderm und Haut;
- (7) Immunregulation.

Einige dieser Funktionen treffen überwiegend auf bestimmte Spezies zu, andere Funktionen wieder auf andere Spezies. Alle sollen im Folgenden kurz angerissen werden:

Reproduktion und Laktation (1) sind primäre Aufgaben des PRL in Säugetieren. Dazu gehören die Entwicklung der Brustdrüse und die Laktation zum Ende einer Schwangerschaft bis über die gesamte Stillzeit. Dabei stimuliert PRL die Expression von Milchproteingenen in „Zusammenarbeit“ mit Östrogen, Progesteron und Insulin (Ferrari, 1981). Bei Patientinnen mit einem PRL-Defizit, wie es z.B. beim Sheehan Syndrom vorkommt, kommt es zu keiner Laktation. In Bezug auf die Reproduktion übt PRL seinen Einfluss auf vielfältige Weise auf die Gonaden aus, indem es die Effekte der gonadotropen Hormone moduliert. So stimuliert es die Anzahl der LH-Rezeptoren während der Pubertät oder in den Ovarien in bestimmten Zyklusphasen, es stimuliert die Steroidproduktion im Corpus luteum sowie die das Größenwachstum in den Ovarialfollikeln (Kelly, Djian, Postel-Vinay & Edery, 1991). In der Prostata soll PRL zu einer Zunahme der Androgenrezeptoren führen (Doppler, 1994).

Die Osmoregulation (2) des PRL ist eine phylogenetisch sehr alte Funktion die besonders bei Amphibien und niederen Vertebraten eine Rolle spielt. Interessanterweise sprechen aber auch Hinweise für eine Funktion in der Osmoregulation und des Wachstums beim Fötus (und Neugeborenen) in Säugetieren, da der Fötus sehr hohen PRL-Konzentrationen in der Amnionflüssigkeit und später auch in niedrigeren Konzentrationen in der Muttermilch ausgesetzt ist (Ferrari, 1981). Auch Wachstum und Morphogenese (3) einzelner Organe und Spezies können PRL abhängig sein, wie z.B. die Leber der Ratte, die bei hohen PRL-Spiegeln hypertrophiert oder bei Tauben zur Ausbildung des Körner-Kropfes führt (Kelly, Djian, Postel-Vinay & Edery, 1991).

Einflüsse auf den Metabolismus (4) sind verschiedenster Art. Man konnte eine Stickstoffretention, eine erhöhte Kalziumexkretion, eine Fettmobilisation und eine beeinträchtigte Glukosetoleranz feststellen (Ferrari, 1981). Diese Vorgänge werden über die Nieren, den Gastrointestinaltrakt und insbesondere über die Leber, die sehr viele PRL-R aufweist, moduliert.

Der Einfluss auf das Verhalten (5) ist insbesondere bei Vögeln ausgeprägt, wo PRL Nestbauaktivitäten und Brutpflegeverhalten steuert. Bei Primaten besteht kein so deutlicher Zusammenhang zum Verhalten, jedoch wurde ein hoher PRL-Spiegel in Verbindung mit einer reduzierten Libido gebracht (Ferrari, 1981). Für die Auslösung des Schutz- und Mutterinstinkts für die Neugeborenen im Humanbereich liegen derzeit keine grundlegenden Studien vor. Inwieweit die Existenz von PRL-Rezeptoren im ZNS Einfluss auf Verhaltensweisen hat, ist noch nicht genauer geklärt. Daneben wird auch die Rolle von PRL als Stresshormon diskutiert, das bei akuten Stresssituationen kurzzeitig ansteigt (Matera, 1997).

Die Auswirkungen auf die Immunregulation (7) werden später ausführlich in Abschnitt 2.3 beschrieben.

#### **2.2.4 Extrahypophysäres Prolaktin - Syntheseorte und Funktion**

Dass PRL nicht nur im HVL durch laktotrope Zellen gebildet wird, sondern auch in anderen Geweben und Lokalisationen im Organismus, wurde erst im Laufe der letzten Jahre entdeckt. Bei Suppressintest bzw. bei hypophysectomierten Säugetieren, bei denen die Hypophyse als Syntheseort für PRL nicht mehr zur Verfügung stand, konnte im Serum dennoch ein geringer, aber messbarer, PRL-Spiegel bestimmt werden, was extrahypophysäre Produktionsorte nahelegte, zumal dort auch PRL-m-RNA gefunden wurde, die identisch mit hypophysären PRL-m-RNA ist (O'Neal, Montgomery & Truong, 1992; Nagy & Berczi, 1991). Nagy und Berczi (1991) konnten in einem Rattenmodell zeigen, dass es nur durch die Kombination aus Hypophysectomie einerseits und Bindung extrahypophysären PRL durch PRL-AK, andererseits zu einer für die Ratte tödlichen Konstellation durch Versagen des lymphohämatopoetischen Systems kam (Nagy & Berczi, 1991).

Dieser interessante und wichtige Aspekt von extrahypophysärem PRL soll in folgendem Abschnitt kurz charakterisiert werden.

- **Reproduktionsorgane**

Prolaktin von Deziduazellen ist identisch mit PRL aus der Hypophyse, wird aber auf molekulargenetischer Ebene anders reguliert. So spielen die beiden Hormone Progesteron und Relaxin die wichtigste Rolle in seiner Regulation (Weigent et al., 1996), wohingegen Dopamin hier seine tonische Inhibition nicht zur Wirkung bringen kann (Thorner et al., 1992). Das von den Deziduazellen produzierte PRL wird im Falle

einer Schwangerschaft in die Amnionflüssigkeit abgegeben und kann dort im zweiten Trimester in Konzentrationen bis zum 100 fachen dessen vorliegen, was im mütterlichen bzw. fetalen Blut gemessen wird (Thorner et al., 1992). Über die Funktion dieses hohen PRL-Spiegels in der Amnionflüssigkeit kann allenfalls nur spekuliert werden. Möglicherweise gelangen Teile des PRL über den Gastro-Intestinaltrakt des Foetus in die Zirkulation und üben dort Einflüsse auf die frühe embryonale Entwicklung der Immunzellen, insbesondere im Thymus, aus.

Weiterhin wurde eine PRL-Produktion in Follikeln des Ovars, in der Placenta und im Myometrium nachgewiesen (Doppler, 1994). Bei Männern konnte die Produktion im Sperma und der Samenflüssigkeit nachgewiesen (Ferrari, 1981); dabei lagen die Spiegel im Sperma um etwa das 1,6 fache höher als im Blut.

- ZNS

Der HVL ist, wie es scheint, nicht der einzige Ort im ZNS an dem PRL synthetisiert wird. Ein sog. *prolactin-like protein* (PLP), das immunreaktive und bioaktive Eigenschaften aufweist, konnte im Kleinhirn, Thalamus, Hippocampus, Nucleus caudatus und Kortex im Rattengehirn nachgewiesen werden. Auch im Rückenmark wurde PLP gefunden, dessen Konzentration unabhängig von der in der Hypophyse bzw. von der im peripheren Blut war (Dracas, 1995).

Die exakte Funktion des neuronalen PRL bleibt weiterhin unklar, jedoch spricht das Vorhandensein von Bindungsstellen im Gehirn zusammen mit dem stimulierenden Effekt auf neuronales Gewebe zur Freisetzung von Neuropeptiden für eine Rolle als Neuromodulator (Weigent et al., 1996).

Im Liquor kann man unter normalen Umständen eine durchschnittliche PRL-Konzentration messen die etwa  $\frac{1}{6}$  der Serumkonzentration entspricht (DeGroot, Cahill & Odell, 1979). Der Ursprungsort dieses PRL mag einerseits vom Plasma über die Blut-Liquor-Schranke stammen, andererseits sprechen auch Hinweise für einen neuronalen Ursprung (Ferrari, 1981).

- Mamma

In der Muttermilch findet man PRL-Konzentrationen, die ungefähr  $\frac{1}{3}$  der des korrespondierenden Serums betragen (DeGroot, Cahill & Odell, 1979). Man geht davon aus, dass dieses Prolaktin nicht aus dem Serum stammt, sondern direkt in der Mamma produziert wird. Es besteht dabei eine positive Korrelation zwischen Muttermilch-Prolaktinspiegel und Serum-Prolaktinspiegel.

- Lymphozyten und periphere mononukleäre Zellen im Blut

Peripheren Lymphozyten können eine 27 kDa Form des PRL produzieren (Matera, 1997). Allerdings wird dieses PRL nur von Lymphozyten produziert, die zuvor durch IL-2 stimuliert wurden.

Auch an zwei Zelllinien der humanen B-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese die Eigenschaft besitzen, PRL Isoformen zu produzieren und zwar eine 23 kDa und eine 26,5 kDa Form (Matera, 1997; Reber, 1993). Dieselben Autoren konnten eine PRL-m-RNA und deren Expression ebenfalls in nicht stimulierten Knochenmarksstromazellen nachweisen.

Wie es scheint, haben jedoch die typischen Regulationsfaktoren der laktotropen Zellen im HVL wie TRH, Dopamin, Östrogen, VIP usw. keinen Einfluss auf die Synthese von lymphozytärem PRL. Dexamethason hat dagegen einen hemmenden Einfluss auf beide PRL-Syntheseorte (Weigent et al., 1996). In diesem Zusammenhang interessant scheint noch die Tatsache, dass Pit-1 zwar eine entscheidende Rolle in der Regulation hypophysären PRL spielt, nicht jedoch in den extrahypophysären Bereichen (Gellerson, Kempf & Telgmann, 1994).

Die Heterogenität der durch Lymphozyten produzierten Isoformen von PRL (Molekulargewicht von 21-29 kDa) kann einerseits auf Glykosilierung zurückgeführt werden, aber es werden noch andere Ursachen vermutet (Weigent et al., 1996). Welche Form dann welche Aufgaben im Immunsystem als parakrine oder autokrine Signalübermittlung erfüllen, ist derzeit noch Gegenstand der Forschung (Matera, 1997).

Stimulierte natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) besitzen ebenfalls die Fähigkeit zur Synthese von PRL (Dracas, 1995). Materna, Bellone et al. konnten in frisch isolierten NK-Zellen zwar PRL nachgeweisen, jedoch keinerlei m-RNA (Materna, Bellone & Lebrun, 1996). Dies legt die Vermutung nahe dass, das PRL nicht selbstsynthetisiert ist sondern vom zirkulierenden PRL-Pool aufgenommen worden ist. Wann eine NK-Zelle PRL produziert, hängt demnach vom Stimulationsgrad ab.

Inkubierte und mit Concanavalin A (Con A) stimulierte Splenozyten zeigten ebenfalls einen Anstieg an bioaktivem PRL im Medium (Weigent et al., 1996; Reber, 1993).

Auf das Zusammenspiel von PRL und Immunzellen wird im Kapitel 2.3.2 genauer eingegangen.

- Thymozyten

Humane Thymozyten produzieren ein 23-24 kDa PRL sowie eine 11 kDa Form, die beide aktiv am Nb2-Lymphom Bioassay reagieren (O'Neal et al., 1992). Dabei handelt es sich um in Laboratorien häufig genutzte Lymphomzellen in einem bestimmten Entwicklungsstadium, die extrem viele PRL-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren und damit auch auf kleinste Mengen PRL empfindlich ansprechen.

Thymusepithelzellen können dahingegen kein PRL herstellen (Dardenne & Savino, 1994).

## **2.2.5 Der Prolaktin-Rezeptor und die intrazelluläre Signaltransduktion**

### **2.2.5.1 Überblick über die Eigenschaften des PRL-Rezeptors**

PRL wirkt auf seine Zielzellen über einen membranständigen Rezeptor. Dieser gehört zur sog. „Hämatopoietin-Zytokin-Rezeptor-Superfamilie“, die Rezeptoren für IL-2 ( $\beta$  und  $\gamma$ ), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, GM-CSF, G-CSF, EPO, GH, IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und andere beinhaltet (Matera, 1997; Kelly, Djian, Postel-Vinay & Edery, 1991). Mitglieder dieser Familie besitzen einige wichtige homologe extrazelluläre Rezeptorregionen, wie beispielsweise zwei gemeinsame Cysteinbrücken. Im Gegensatz dazu weisen die intrazellulären Domänen nur wenig homologe Sequenzen auf, jedoch ist ihnen die „Box-1“-Region gemeinsam, eine Region, die wichtig für die intrazelluläre Signaltransduktion ist (Matera, 1997). Aufgrund dieser Rezeptorhomologien können beispielsweise die „verwandten“ Hormone PRL und GH an gemeinsamen Rezeptoren binden. Auch eine Bindung von PRL an den EPO-Rezeptor ist denkbar, da in früheren Studien gezeigt wurde, dass PRL die Erythropoese stimuliert (Reber, 1993).

Aber nicht nur plasmamembranständige Rezeptoren sind beschrieben, es finden sich auch Rezeptoren in den Endosomen, im Golgi-Apparat und an intrazellulären Membranen (Kelly, Djian, Postel-Vinay & Edery, 1991). Diese Lokalisation spricht wahrscheinlich für eine erhöhte Synthese von Rezeptoren. Zusätzlich wurden aber auch PRL-R im Zytosol von Hepatozyten und eine lösliche Form in der Milch gefunden (Kelly et al., 1991).

Arden et al. (1990) gehen davon aus, dass für den PRL-R nur ein einziges Gen kodiert. Dessen Lokalisation wird von den Autoren auf Chromosom 5p13→p14 angegeben (Kelly et al., 1991).

In den letzten Jahren konnten einige PRL-Rezeptorsubtypen in verschiedenen Säugetierspezies isoliert werden. Ebenso konnten auch verschiedene Rezeptorsubtypen innerhalb des selben Zelltyps nachgewiesen werden, deren Expression wahrscheinlich hormonreguliert ist (Jabbour & Kelly, 1997).

### **2.2.5.2 Lokalisation des Prolaktinrezeptors**

#### **2.2.5.2.1 PRL-Rezeptoren exprimierende Gewebe**

PRL-Rezeptoren werden von verschiedenen Geweben und Zellen des Organismus exprimiert. Die Funktion und Aufgabe von PRL in einigen dieser Lokalisationen ist

bisher noch nicht bekannt. Die folgende Aufzählung gibt einen Überblick in welchen Geweben PRL-R exprimiert werden: (Zusammengestellt nach: Doppler, 1994; Ferrari, 1981; Kelly et al., 1991; Jabbour & Kelly, 1997; Hondo, Kurohmaru, Sakai, Ogawa & Hayashi, 1995)

- Milchdrüse: Drüsengewebe, Milch
- Ovar: Granulosa Zellen, Corpus luteum
- Hoden: Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen, Spermatozoen und Vorläuferzellen
- Uterus & Plazenta
- Nebenhoden, Samenbläschen, Prostata
- Nebenniere: Zona fasciculata, Zona reticularis
- Niere
- Intestinaltrakt
- Zellen des lymphatischen und Immunsystems: s. Kapitel 2.3.2...
- Auge: Photorezeptoren der Retina, Choroidea
- Pankreas: Langerhans´sche Inselzellen
- Leber
- ZNS: Hypothalamus, Substantia nigra, Plexus choroideus

2.2.5.2.2 PRL-Rezeptoren auf Zellen des Immunsystems

Funktionelle Rezeptoren werden von vielen Zellen des Immunsystems exprimiert. Dazu gehören die folgenden periphere Blutzellen in Tabelle 7a und b:

**Tabelle 7a:** Häufigkeitsangaben für PRL-Rezeptor-positive periphere Blutzellen in verschiedenen Geweben des Immunsystems (k.A. = keine Angaben; Häufigkeitsangaben schwanken je nach Literaturangabe und sind mit dem höchsten bzw. niedrigsten Wert wiedergegeben.) Zusammengestellt nach: Weigent et al., 1996; Dracas, 1995; Matera, 1997; Reber, 1993; Dardenne, Leite de Moraes et al., 1995, Kelley et al., 1992b.

periphere Blutzellen	Häufigkeit PRL-R <sup>+</sup> Zellen
Lymphozyten gesamt	65%-75%
T-Lymphozyten:	75%
CD4 <sup>+</sup>	70%-75%
CD8 <sup>+</sup>	70%-75%
B-Lymphozyten	100%
natürliche Killerzellen	k.A.
Monozyten/Makrophagen	100%
Neutrophile Granulozyten	k.A.

Daneben können PRL-R auch noch in anderen Geweben des Immunsystems nachgewiesen werden wie in Tabelle 7b dargestellt.

**Tabelle 7b:** Häufigkeit PRL-Rezeptor-positiver Zellen in verschiedenen Geweben des Immunsystems (Weigent et al., 1996; Leite de Moraes, Touraine & Gagnerault, 1995)

Gewebe	Häufigkeit PRL-R <sup>+</sup> Zellen
Knochenmarkzellen	50%-85%
Thymusepithelzellen	>80%
Milz	70%
Lymphknoten	65%

Der PRL-R wurde ebenfalls auf myeloischen Leukämiezellen und Burkitt-Lymphomzellen beschrieben (Matera, 1997).

Die Anzahl der auf den primären T- und B-Zellen sitzenden Rezeptoren wird von Matera (1997) mit 360 pro Zelle angegeben, NK-Lymphozyten exprimieren im Durchschnitt 660 Rezeptoren pro Zelle. Dabei lässt die Bindungsaffinität der exprimierten Rezeptoren ( $K_D = 10^{-10} - 10^{-9}$  M) den Schluss zu, dass diese auf physiologische PRL-Konzentrationen ansprechen (Matera, 1997). Die Nb2-Lymphomzellen, die bei ihrer Proliferation auf die Anwesenheit von PRL angewiesen sind, exprimieren im Durchschnitt 12.000 Rezeptoren/Zelle und werden deshalb als empfindliche Marker für die Anwesenheit von PRL (bis zu picomolaren Konzentrationen) in der Forschung angewendet (Weigent et al., 1996; Goffin, Bouchard & Ormandy, 1998).

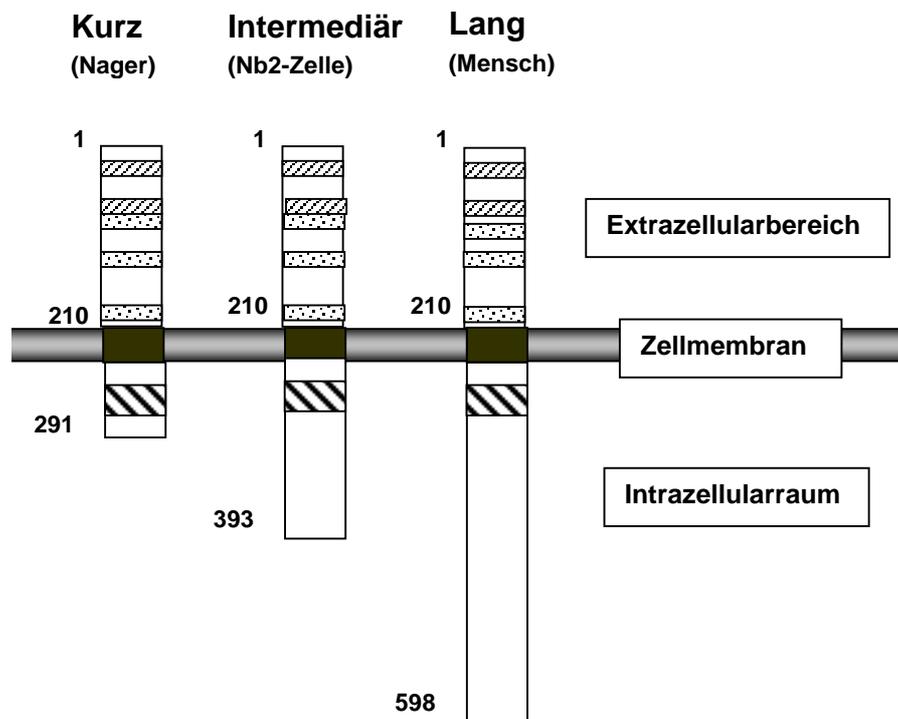
Leite de Moraes et al. (1995) untersuchten die Anzahl der PRL-R-positiven T-Zellen, sowie die Rezeptordichte dieser Zellen vor und nach Stimulation mit dem T-Zell-Mitogen ConA. Sie konnten einen signifikanten Rezeptoranstieg nachweisen, der sich in einer erhöhten Rezeptordichte bemerkbar macht, nicht jedoch in der Anzahl der PRL-R-positiven T-Zellen (Leite de Moraes, Touraine & Gagnerault, 1995). Die Rezeptorzahl kann daneben auch durch IL-2 und PRL selbst erhöht werden (Yu-Lee, 1997).

Untersuchungen, wie sie oben aufgeführt sind, legen eine Beteiligung von Prolaktin an Immunreaktionen des Organismus nahe.

### **2.2.5.3 Aufbau des PRL-Rezeptors**

Bislang wurden bei Säugern zwei verschiedene Rezeptorsubtypen für PRL klassifiziert: Eine „Langform“ (80-85 kDa) und eine „Kurzform“ (42-45 kDa) des Rezeptors

(Clevenger, Freier & Kline, 1998; Yu-Lee, 1997). Dabei beziehen sich die Bezeichnungen auf die Größe der Aminosäuren(AS)-Ketten. Die lange und kurze Form variieren dabei aber nur in der intrazellulären Domäne, die extrazelluläre Kette hat stets die gleiche Länge (Kelly et al., 1991). Schematisch sind die Rezeptoren und ihre AS-Kettenlänge in der folgenden Abbildung 10 dargestellt.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der drei bisher bekannten PRL-Rezeptorsubtypen mit Angabe der AS-Kettenlänge und identischer Regionen (modifiziert n. Jabbour & Kelly, 1997, p.15 und Kelly et al., 1991, p. 239)

Den zwei Formen des Rezeptors liegen jedoch nicht zwei verschiedene Gene zugrunde, sondern sie sind Produkte alternativen Splicings und stammen von einem einzigen Gen. Eine Sonderposition nimmt ein dritter Rezeptorsubtyp ein, der bisher nur auf Nb2-Lymphomzellen gefunden wurde. Seine Form wird als „Intermediärform“ bezeichnet (ca. 65 kDa), da die Länge der AS-Kette zwischen der der beiden anderen liegt (Jabbour & Kelly, 1997).

Beim Menschen ist bisher nur eine „Langform“ des Rezeptors beschrieben, die eine Gesamtlänge von 598 AS aufweist (Jabbour & Kelly, 1997; Kelly et al., 1991). Dabei liegen 210 AS im extrazellulären Bereich, 364 AS im zytoplasmatischen und 23 AS im intramembranen Bereich.

Eine biologische Aktivität in Form einer Genstimulation nach hormoneller Aktivierung z.B. die Transskription von Milchproteingenen ( $\beta$ -Casein,  $\beta$ -Laktoglobulin) oder des Interferon regulierenden Faktors-1 (IRF-1) erfolgt nur bei der Lang- und Intermediärform des PRL-Rezeptors (Jabbour & Kelly, 1997). Für die Kurzform konnte bisher noch keine spezifische Funktion etabliert werden.. Vonderhaar B. und Das R (1995) konnten jedoch zeigen, dass sowohl die Lang- als auch die Kurzform des PRL-R einen mitogenen Einfluss auf die Zellen haben und so diese zum Wachstum stimulieren können.

#### **2.2.5.4 Regulation der PRL-Rezeptorexpression**

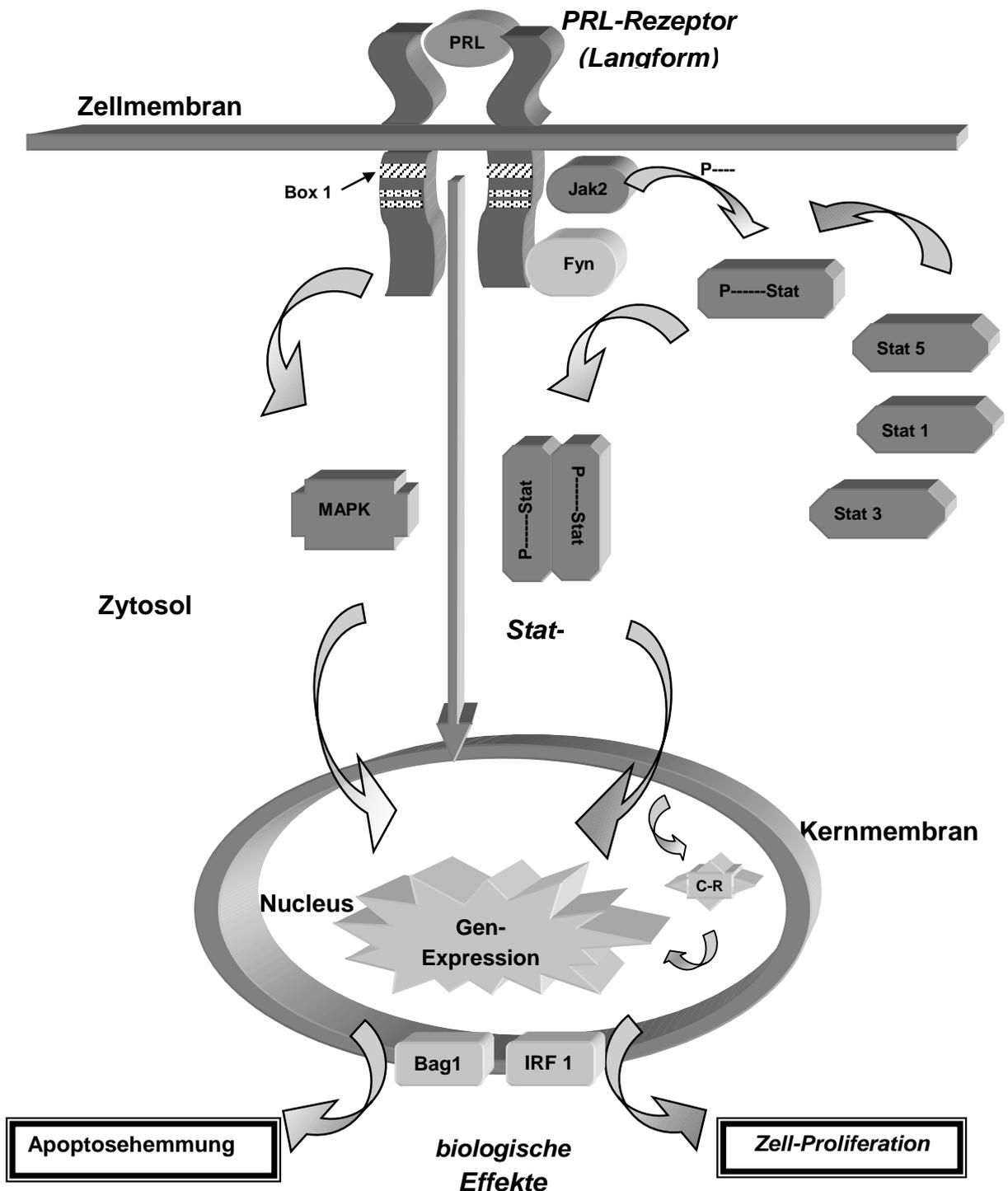
Die Up- und Down-Regulation der Rezeptoren auf der Zellmembran ist hormonabhängig und wird für die einzelnen Zielorgane unterschiedlich gesteuert. So nehmen die Rezeptoren in der Milchdrüse in der frühen Laktationsphase stark zu. In der Leber werden bei weiblichen Individuen mehr PRL-R gemessen als bei männlichen, diese werden noch zusätzlich durch Östrogene gesteigert (Kelly et al., 1991). Auch Steroide haben einen Up-regulierenden Effekt auf die Anzahl der Rezeptoren in der Leber, wobei dieser Effekt auch indirekter Natur sein könnte wie Kelly et al. (1991) spekulieren, nämlich über eine erhöhte PRL-Sekretion.

In den meisten der untersuchten Gewebe hat PRL selbst einen direkten Einfluss auf seine Rezeptorexpression, abhängig von der Konzentration und Dauer der Einwirkung von PRL auf die Zielzellen. So führen hohe PRL-Spiegel zu einer Down-Regulation der Rezeptoren, während es bei moderaten PRL-Werten wieder zu einer Up-Regulation kommt (Kelly et al., 1991).

#### **2.2.5.5 Intrazelluläre Signaltransduktion**

Eine intrazelluläre Signaltransduktion erfolgt nach Bindung des PRL-Moleküls an seinen Rezeptor, vermutlich nur bei der Lang- und Intermediärrezeptorform. Die Signaltransduktion verläuft dabei jedoch ohne die klassischen Second-Messenger, sondern über eine Gruppe von rezeptorassoziierten Proteinkinasen.

In der Abbildung 11 werden schematisch die intrazellulären Abläufe nach Aktivierung eines PRL-Rezeptors durch sein Hormon dargestellt werden: Es konnte gezeigt werden, dass es nach hormoneller Stimulation des PRL-R zu einer Tyrosin-Phosphorylierung einiger intrazellulärer Proteine kommt. Dies setzt das Vorhandensein einer Proteinkinase voraus, die als Janus-Tyrosin-Kinase-2 (JAK2) identifiziert wurde (Goffin, Bouchard & Ormandy, 1998). Sie ist eine der vier Proteinkinasen der JAK-Familie, die die intrazelluläre Signaltransduktion in der Zytokin-Rezeptor-Superfamilie mediert (Goffin et al., 1998).



**Abbildung 11:** Schema der intrazellulären Signaltransduktion des PRL-Rezeptors (Langform) in Lymphozyten. Nach dem Andocken von PRL werden neben dem Jak/Stat-Pfad auch andere Signalmechanismen in Gang gesetzt. Die Translokation von PRL selbst in den Nucleus wird diskutiert. Zur genaueren Erläuterung der einzelnen Abläufe s. Text. (P---

Stat = phosphoryliertes Stat; C-R = Glukokortikoidrezeptor, Jak2 = Janus-Tyrosin-Kinase-2, MAPK = Mitogen activated protein kinase, Fyn = spez. Kinase). Zusammengestellt n. Clevenger, Freier & Kline, 1998 und Goffin et al., 1998

Die sog. Box-1 (s. Abbildung 11), eine prolinreiche Domäne im Rezeptormolekül nahe der Zellmembran, wird für die Verbindung des Rezeptors mit der Kinase benötigt. Die rezeptorassoziierte JAK2 wird schnell (innerhalb von 5 min) nach dem Andocken von PRL an den Rezeptor aktiviert (Clevenger, Freier & Kline, 1998). Die Tyrosinkinase JAK2 führt dann zur Phosphorylierung von Tyrosinresten, berichten Goffin et al. (1998).

Eine andere Gruppe zytosolischer Proteine, die für die weitere Signaltransduktion wichtig ist, stellt die Gruppe der Stat-Proteine (engl. für signal transducer and activator of transcription) dar. Drei Mitglieder der „Stat“-Familie spielen bei der Signalübermittlung von aktivierten PRL-R eine Rolle und zwar Stat5a und 5b, Stat1 und Stat3. Diese „Stats“ binden an das phosphorylierte Tyrosin des aktivierten Rezeptors und dissoziieren dann vom Rezeptor weg. Zwei solcher Stat-Proteine dimerisieren zu einem Stat-Dimer, das in den Zellkern transloziert. Dort interagieren und aktivieren die Stat-Dimere mit spezifischen Promotoren der Zielgene (Goffin et al., 1998).

Wichtige wachstums- und proliferationsbezogene Zielgene in Zellen des Immunsystems sind u.a. die Ornithine-Decarboxylase (ODC) und der Interferon-regulierenden-Faktor-1 (IRF1), auf den im Kapitel 2.2.5.6 noch genauer eingegangen wird. Ein anderes Gen welches aktiviert wird, ist das Bcl-2-associated anti-death gene 1 (Bag-1). Dieses Gen spielt nach Clevenger et al. (1998) eine wichtige Rolle im Anti-Apoptose-Effekt, den PRL auf Lymphozyten ausübt (Clevenger, Freier & Kline, 1998).

Andere Gewebe weisen natürlich auch andere Zielgene auf, wie z.B. in der Brustdrüse die Milchproteingene (Casein, Laktoglobulin, etc.), Proteine für die Laktosesynthese (Laktosesynthetase, Laktalbumin, etc), oder im Ovar (LH-Rezeptor) etc. Um eine intrazelluläre Signaltransduktion nach Rezeptoraktivierung wieder zu stoppen, müssen die modifizierten Tyrosinreste in den ursprünglichen Zustand versetzt werden. Dies geschieht mit Hilfe von Tyrosin-Phosphatasen (Goffin et al., 1998).

Kürzlich beschrieben Stoecklin et al. (1997) eine Interaktion zwischen Stat5 und dem intrazellulären Glukokortikoidrezeptor (C-R → s. Abbildung 11) (Stöcklin, Wissler, Moriggl & Groner, 1997). Dies könnte eine mögliche Erklärung des Anti-Apoptose-Effekts von PRL auf Immunzellen sein, wie es noch in Kapitel 2.3.1.2 ausgeführt wird.

Clevenger et al. (1998) konnten auch zeigen, dass PRL selbst in IL-2 stimulierten Lymphozyten in den Zellkern transportiert wird, wo es eine Bedeutung in der PRL-induzierten Proliferation dieser Zellen hat. Weigent (1996) geht davon aus, dass unter gewissen Umständen der PRL-Rezeptor seine immunmodulatorische Wirkung dadurch ausübt, dass er als Transportmolekül dient, der PRL in den Nucleus bringt. Die Internalisierung von extrazellulärem PRL erfolgt dabei innerhalb von 30 min (Prystowsky & Clevenger, 1994). Wie aber dann das PRL im Zellkern seine Wirkung entfaltet, ist bisher noch nicht bekannt (Weigent et al., 1996).

### **2.2.5.6 Bedeutung des Interferon-regulierenden-Faktors-1 (IRF-1)**

Zum Verständnis des PRL als immunregulierenden Faktor hat sich u.a. die Aktivierung des IRF-1 herausgestellt, da dieser Faktor in der Lage ist, eine weitere Reifung und Differenzierung in Immunzellen hervorzurufen (Yu-Lee, 1997).

Neben PRL können auch IL-2 und ConA, eine mitogene Substanz, in verschiedenen untersuchten Zelllinien (Nb2-Lymphomzellen, L2-T-Zellen) den IRF-1 induzieren (Yu-Lee, 1997). IRF-1 hat spezifische intranukleäre DNA-Bindungsstellen und kann dabei von IRF-2 antagonisiert werden. Folgende Funktionen dieses multifunktionellen Transskriptionsfaktors sind bisher in u.g. Zellen beschrieben (Yu-Lee, 1997):

- myeloischen Zellen: → Differenzierung
- Fibroblasten: → Tumorsuppression, antiproliferativ
- B-Lymphozyten: → Differenzierung, Apoptose
- T-Lymphozyten: → Differenzierung, Apoptose, Proliferation
- IFN- $\gamma$  sensiblen Makrophagen: → Aktivierung

Um Auswirkungen auf das Immunsystem zu erforschen, benutzte man Tiere mit einem defekten Gen für IRF-1. Diese zeigten eine 90%ige Reduktion in CD8<sup>+</sup>-Zellen, eine verminderte Funktion der Makrophagen und ebenso eine verringerte Kompetenz, bestimmte Viren zu eliminieren (Yu-Lee, 1997).

In T-Zellen korreliert die IRF-1-Expression mit der Aktivierung, der Progression im Zellzyklus hin zur S-Phase und mit der Zellproliferation.

Die Expression des IRF-1 in Bezug auf PRL-stimulierte Zellen wird nach einem Review von Yu-Lee (1997) durch die JAK sowie Stat Proteine 1 und 5 bewerkstelligt. Nach der Stimulation des PRL-R kommt es zur Translokation von Stat1 und Stat5 in den Nucleus, wo sie an der Up- und Down-Regulation des IRF-1 Gens beteiligt sind. IRF-1 bindet dann an bestimmte Basensequenzen der DNA und zwar an Gen-Promotoren. Darunter befinden sich die Gene für IRF-2, IFN- $\beta$ , Ornithin-Decarboxylase (ODC), MHC I, IL4 bis IL7, also Produkte die für die Immunregulation von Bedeutung sind.

Jedoch hängt das Ergebnis einer IRF-1-Stimulation sehr vom Zelltyp und seiner Differenzierung und Entwicklung im lymphatischen Gewebe ab. Somit ist die genauere Untersuchung der PRL-Aktivierung und des anschließenden intrazellulären JAK/Stat/IRF-1-Pfades ein weiterer Schritt in der Erkenntnis der intrazellulären, molekularbiologischen Abläufe in Zellen des IS, die durch PRL modifiziert werden können.

## **2.3 Prolaktin und Immunsystem**

Erste mögliche Hinweise auf eine Verbindung zwischen endokrinem und immunologischem System erkannte P.E. Smith bereits in den 30er Jahren des 20. Jhd., als er bei hypophysectomierten Ratten eine Involution des Thymus feststellte (Smith, 1930). Konkretere Studien zu diesem Thema begannen Mitte der 60er Jahre als man ein Immundefizit in Mäusen mit einem angeborenen Mangel an PRL und anderen HVL-Hormonen sah. Man konnte zeigen, dass eine Thymusinvolution aufgrund eines PRL-Mangels durch die exogene Zufuhr von PRL reversibel war, ebenso konnte die Immunfunktion wieder hergestellt werden (Weigent et al., 1996). Damals dachte man zuerst, dass es sich eben 'nur um eine weitere Funktion' des PRL handelte (Matera, 1997). Mittlerweile ist aber die Erkenntnis um die enge Verknüpfung zwischen dem IS und PRL derart gewachsen, dass seine Einflüsse wie die der Zytokine nicht mehr daraus wegzudenken sind.

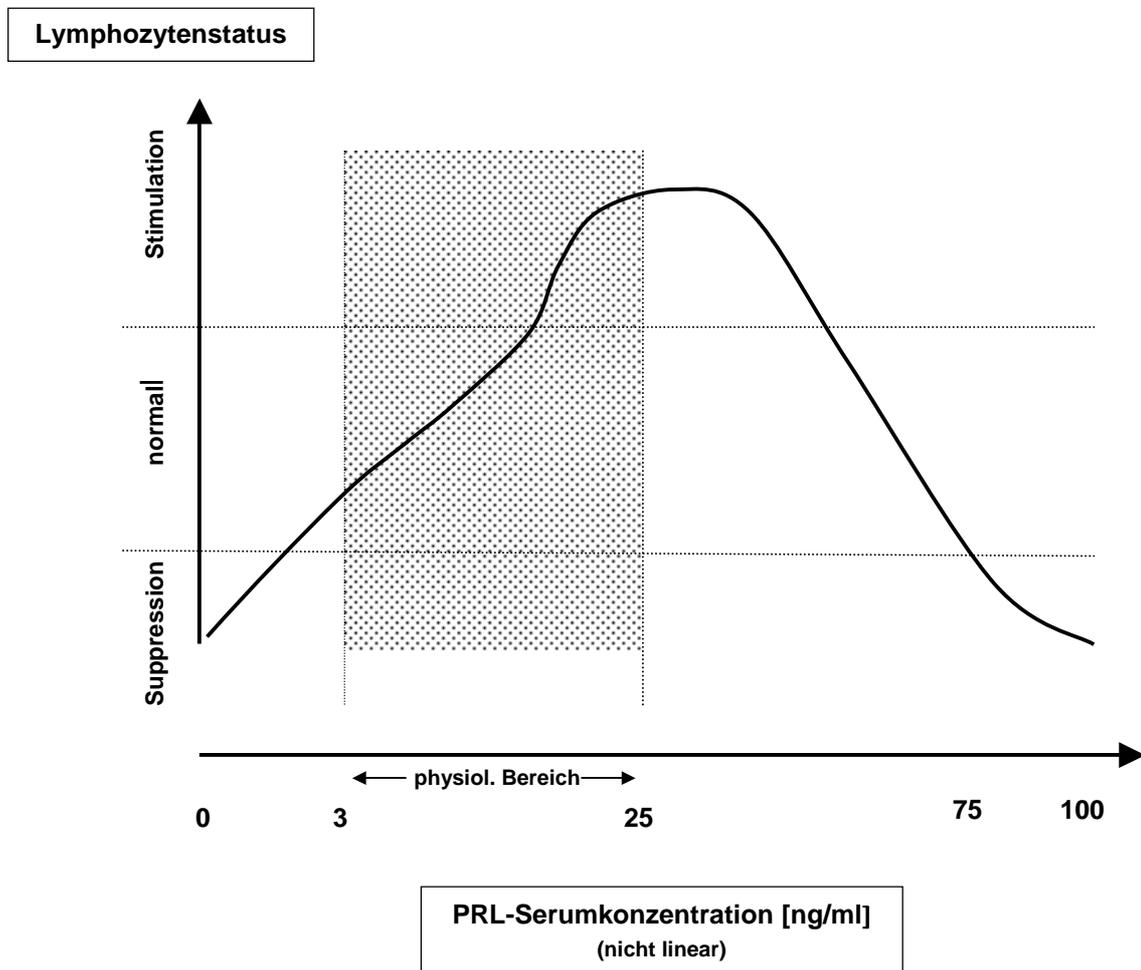
In neuerer Zeit zeigten in vivo- und in vitro-Untersuchungen, dass PRL mit den Zytokinen von Lymphozyten interagieren kann und diese im Gegenzug die PRL-Synthese in den Immunzellen beeinflussen können (Matera, 1997). Weiterhin bestehen die bereits besprochenen Rezeptorhomologien. PRL wird heutzutage nicht mehr nur in seiner Rolle als endokrines Hormon, sondern auch in der eines Zytokins diskutiert, das über spezielle Rezeptoren seine Wirkung entfalten kann die von den Immunzellen exprimiert werden.

Die Fähigkeit, in die Immunfunktion eines Organismus einzugreifen, beruht auf seinem Potential, regulierend auf die Proliferation, die Differenzierung und Apoptose der Immunzellen einzugreifen. Dies erfolgt nicht nur über den klassischen endokrinen Mechanismus, sondern auch über para- und autokrine Vorgänge, da einige Zellen des IS selbst in der Lage sind PRL zu synthetisieren.

### **2.3.1 Beeinflussung der Immunkompetenz**

Der Spiegel von PRL im Serum hat einen entscheidenden Einfluss auf die Immunkompetenz des Organismus. Sowohl eine Hyperprolaktinämie als auch eine Hypo-

prolaktinämie haben eine immunsuppressive Wirkung (Matera, 1997), was man in folgender Abbildung wiedergeben kann (Abbildung 12):



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Auswirkung unterschiedlich hoher PRL-Serumkonzentrationen auf die Aktivität und Proliferation von Lymphozyten, insbesondere der NK-Zellen. Das Maximum liegt im oberen physiologischen Normbereich, wohingegen Werte darüber bzw. darunter zu einer Hemmung der Lymphozytenaktivität führen. (Graphik in Anlehnung an Zahlenmaterial nach Matera, 1997).

Die Hemmung der Lymphozyten-Aktivität unter hohen PRL-Konzentrationen erklärt Matera (1997) einerseits mit einer PRL-Rezeptor-Down-Regulation in den Zellen. Es könnte aber auch in einer Signalweiterleitungshemmung begründet sein aufgrund der Formation monomerer PRL--PRL-R-Komplexe.

Somit ist es von entscheidender Bedeutung für eine physiologische Immunkompetenz einen normalen PRL-Spiegel im Serum zu besitzen. Ein mässiger Anstieg von PRL in einer Stressituation könnte die immunsuppressive Wirkung der Glucocorticoide, die durch die HHN-Achse vermehrt ausgeschüttet werden, ausgleichen. Auf

der anderen Seite wird eine chronische PRL-Erhöhung in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen gesehen.

Hypophysektomierte Ratten bzw. Ratten, bei denen die PRL-Freisetzung durch Bromocriptin (BCR) blockiert wurde, entwickelten eine Anämie, Leukopenie, Thrombocytopenie und zeigten eine verminderte Antikörperproduktion nach dem Kontakt mit *E. coli* Lipopolysacchariden (LPS) oder Schaferythrozyten (Matera, 1997). Ebenso konnte eine reduzierte lymphokinabhängige Makrophagenstimulation und INF- $\gamma$  Produktion durch Lymphozyten gezeigt werden (Matera, 1997). Bei all diesen Untersuchungen konnten die Suppressionseffekte antagonisiert werden entweder durch die exogene Zufuhr von PRL, nicht jedoch durch andere HVL-Hormone, oder durch die Implantation einer Hypophyse unter die Nierenkapsel (Matera, 1997).

Di Carlo et al. und Bernton et al. in (Clevenger, Freier & Kline, 1998) konnten an Mäusen zeigen, dass die Zufuhr von PRL eine signifikante Senkung der Mortalität nach der Exposition bzw. Injektion von *Salmonella typhimurium* bzw. *Listeria monocytogenes* hervorrief. Dieser Effekt beruht vermutlich auf dem regulierenden Einfluss des PRL auf INF- $\gamma$  das von den T-Lymphozyten stammt. So zeigten die Ergebnisse von Benedetto et al. in (Clevenger, Freier & Kline, 1998), dass eine letale Menge an *Toxoplasma gondii* bei gleichzeitiger Gabe von PRL und INF- $\gamma$  zu einer Überlebensrate von 75% der betroffenen Mäuse führte.

Bernton und Mitarbeiter (1991) konnte außerdem zeigen, dass neben der erhöhten Letalität bei BCR behandelten Mäusen die mit *Listerien* infiziert wurden, auch die Aktivierung der Makrophagen durch die T-Zellen aufgehoben war, die INF- $\gamma$  Produktion der T-Zellen zurückging, die T-Lymphozytenproliferation vermindert war, jedoch die IL-2 Produktion nicht betroffen war. All diese durch BCR hervorgerufenen Effekte konnten in vivo durch die gleichzeitige Administration von PRL revidiert werden. Um zu zeigen, dass die Immunsuppression durch BCR Behandlung nicht an der Substanz BCR selbst liegt, wurden Versuche mit Cysteamin gemacht, eine Substanz, die PRL durch direkten Angriff auf die Disulfidbrücken hemmt, also einen komplett verschiedenen Angriffspunkt auf das PRL hat wie BCR. Auch darunter konnten die immunsuppressiven Ergebnisse bestätigt werden sowie die Immunkompetenz durch PRL-Gabe wiederhergestellt werden.

Der Einfluss des PRL ist von Bedeutung in der richtigen Funktion der Immunzellen, weniger in der absoluten Zahl der Zellen. Untersuchungen an gentsch manipulierten Mäusen, die kein PRL mehr synthetisieren konnten, zeigten keine Reduktion der Zahl der B- und T-Lymphozyten in LK, Blut, Thymus oder Milz.

### 2.3.1.1 Einfluss auf den Thymus

Im Thymus kommt es zur Reifung von aus dem Knochenmark ausgewanderten T-Vorläuferzellen. Dort unterliegen sie einem strengen Selektionsprozess, in dem die T-Zellen dahingehend differenziert werden sollen, dass sie „Selbst“ von „Fremd“ unterscheiden können. Lymphozyten, die diese Selektion meistern, wandern dann in periphere lymphatische Organe aus, die anderen gehen am induzierten Zelltod (Apoptose) zugrunde.

Insbesondere die Thymusepithelzellen (TEC), die den Hauptbestandteil des „thymic microenvironments“ ausmachen, haben einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung und Differenzierung der T-Lymphozyten u.a. durch direkten Zell-Zell-Kontakt, und somit auf die korrekte Funktion des IS in einem Organismus.

Eine Unterfunktion des HVL wird seit der Erstbeschreibung von Smith (1930) in Zusammenhang mit einer Abnahme des Thymusgewichts und der Thymusfunktion gebracht.

Die Thymusdrüse selbst hat einen endokrinen Einfluss auf die Immunfunktion, wie man aus Versuchen bei Tieren weiß, die keinen Thymus besaßen und deren Immunfunktion durch die Gabe von Thymusextrakten wiederhergestellt wurde. Bei alleiniger Zufuhr von HVL-Hormonen war dies nicht möglich (Gala, 1991), was für die Einbeziehung des Thymus in die vollständige Funktion des IS spricht. Aber auch exogene Faktoren können die Thymusfunktion modulieren, so beispielsweise PRL, Steroide, Schilddrüsenhormone und GH (Dardenne & Savino, 1994). Darum soll der Einfluss von PRL auf die Thymusekretion und auf die Zellen des Thymusepithels näher betrachtet werden. Die Wirkung von PRL auf den Thymus wird über PRL-Rezeptoren vermittelt, die von den Thymusepithelzellen exprimiert werden (Leite de Moraes et al., 1995).

Mittlerweile wurden einige Thymusfaktoren näher untersucht und beschrieben, welche das Immunsystem beeinflussen können. Einer davon ist Thymopoietin (früher auch Thymin genannt) ein Polypeptid aus 49 AS. Zwei weitere sind Thymosin  $\alpha_1$  und Thymulin. Thymosin  $\alpha_1$  wirkt auf die Reifung der T-Zellen und fördert deren Sekretion von MIF und hat Einfluss auf die Proliferation der B-Zellen (Gala, 1991). Thymulin stimuliert u.a. die IL-2 Synthese in T-Zellen und fördert die Zytotoxizität dieser Zellen. Geringe Dosen scheinen einen unterstützenden Effekt auf das IS auszuüben, wohingegen hohe Dosen hemmend wirken (Gala, 1991).

Den Einfluss von PRL auf den Thymus untersuchten Dardenne et al. (zitiert nach Gala, 1991). Sie konnten feststellen, dass die PRL-Gabe bei normalen Mäusen die Thymulinserumspiegel ansteigen ließ. Ebenso konnten diese Spiegel bei gealterten Mäusen mit atrophiertem Thymus wieder gesteigert werden. BCR hatte jeweils den

entgegengesetzten Effekt. In einer klinischen Untersuchung wurde gezeigt, dass Patienten mit einer Hyperprolaktinämie auch erhöhte Thymulinspiegel aufwiesen (Gala, 1991). Diese Effekte scheinen direkter Natur zu sein, denn sie sind auch in vitro nachvollziehbar (Dardenne & Savino, 1994).

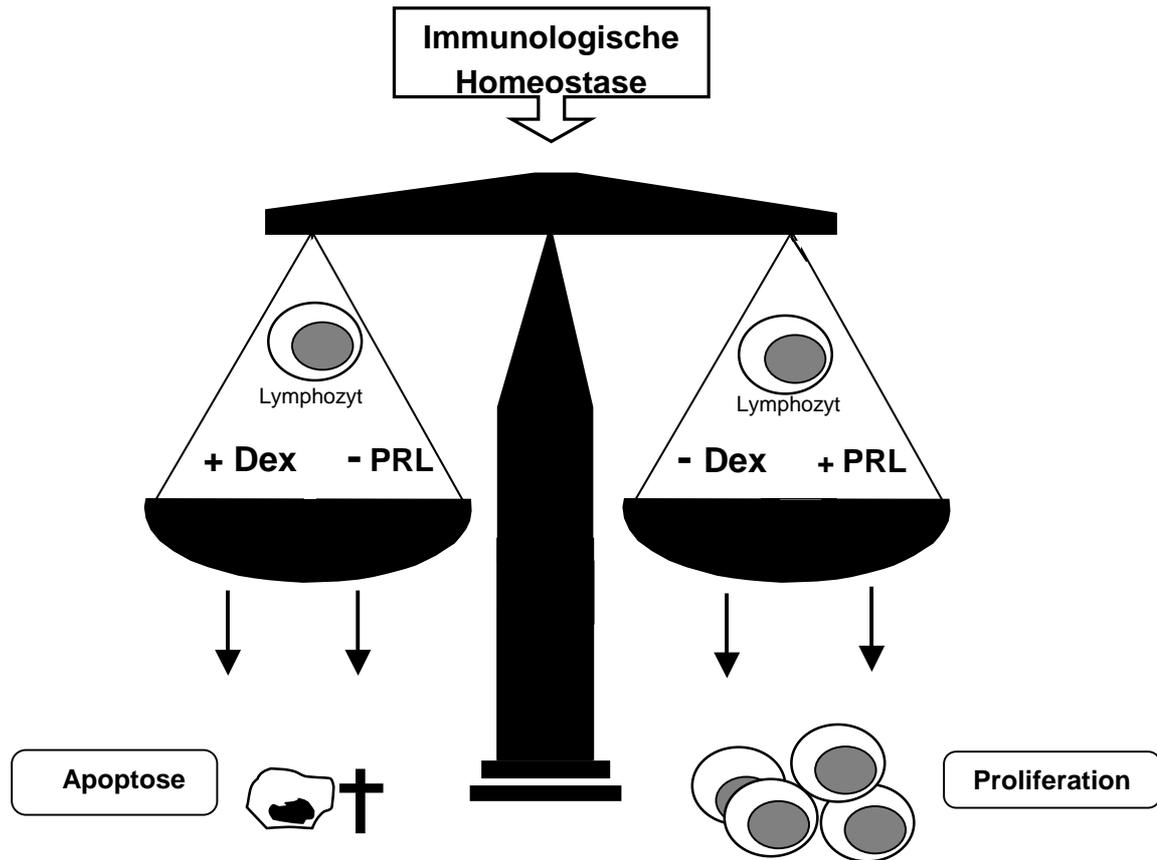
1987 konnten Davila, Brief, Simon, Hammer & Kelly zeigen, dass es auch beim Altern von Ratten zu einer Atrophie des Thymus kommt, daneben zu einer verminderten Immunfunktion. Die Atrophie und die Immundefizite konnten durch die Behandlung mit PRL rückgängig gemacht werden.

Ein weiterer wichtiger Faktor wurde von Pellegrini et al. (1992) untersucht. Sie konnten zeigen, dass Thymozyten, jedoch nicht die TEC, die Fähigkeit haben, eine PRL-m-RNA zu exprimieren und in ein PRL-ähnliches Polypeptid zu translatieren. Man kann daher davon ausgehen, dass PRL seine Wirkung am Thymus nicht nur auf endokrinem, sondern auch para- und autokrinem Weg umsetzt (Dardenne & Savino, 1994).

### **2.3.1.2 PRL als Gegenspieler zu Glucocorticoiden**

PRL, ACTH, TSH und andere Hormone steigen bei einer akuten Stresssituation oder nach einer immunologischen Herausforderung an.

Sie werden deshalb auch als Stresshormone bezeichnet. Der folgende Anstieg von Cortisol hat auf das IS einen tendentiell immunsuppressiven Effekt, der u.a. durch eine frühzeitige Apoptose der T-Vorläuferzellen hervorgerufen wird. Einige Autoren gehen davon aus, dass der gleichzeitige Anstieg von PRL mit seiner immunstimulierenden Potenz die Auswirkungen der Glucocorticoide auf das immunologische System ausgleicht (Matera, 1997). Vergleiche dazu Abbildung 13 auf der folgenden Seite:



**Abbildung 13:** Immunologische Homeostase als Gleichgewicht zwischen den gegensätzlich wirkenden PRL und Glucocorticoiden. Während Glucocorticoide die Proliferation hemmen und die Apoptose triggern, stimuliert PRL die Proliferation und fördert das Überleben. (Dex = Dexamethason, PRL = Prolaktin); modifiziert nach Clevenger, Freier & Kline, 1998, p.188

Bernton, Bryant, Holaday & Dave, (1992) konnten zeigen, dass es bei Mäusen, die auf der einen Seite mit PRL und Corticosteroiden behandelt wurden, zu einer signifikanten Reduktion des immunsuppressiven Effekts auf Milzzellen kam, wie es bei der alleinigen Gabe von Corticosteroiden zu beobachten war. Eine gleichzeitige Behandlung mit BCR zeigte ähnliche Resultate, da sie mit einem Abfall an PRL einherging. Ein *in vitro* aufgebauter Versuch zeigte, dass die suppressiven Effekte von Glucocorticoiden an Lymphozyten nicht allein durch die Zugabe von PRL zu beheben waren, was für eine indirekte Wirkung des PRL spricht.

Während Glucocorticoide die Proliferation von Lymphozyten hemmen und eine Apoptose triggern, bewirkt PRL Gegenteiliges, nämlich eine Stimulation der Lymphozyten und eine verbesserte Überlebensrate der Lymphozyten. Dieser Effekt konnte *in vitro* an den Nb2-Lymphomzellen nachgewiesen werden (Clevenger, Freier & Kline, 1998).

Bei Untersuchungen an Mäusen konnten Bernton und Mitarbeiter (1992) zeigen, dass immunsuppressive Dosen von Corticoiden eine PRL-Rezeptor Down-Regulation an Leberzellen hervorrief. Die zusätzliche Gabe von PRL konnte diese Down-Regulation verhindern. Die alleinige Gabe von PRL in vivo führte zu einer Upregulation des PRL-R.

Betrachtet man die Aktivität der intrazellulären Ornithin-Decarboxylase (ODC), ein Schlüsselenzym, das einen limitierenden Faktor bei der Zellproliferation und Proteinsynthese darstellt, so erreicht man nach PRL Gabe eine gesteigerte Aktivität von ODC in Milz und Thymuszellen. Versuchstiere mit einem Mangel an ACTH und Glucocorticoiden zeigen ebenfalls eine erhöhte ODC Aktivität, was den Schluss nahelegt, dass Glucocorticoide die basale ODC Funktion supprimieren, also gegensätzlich zum PRL wirken (Bernton et al., 1991).

Die entgegengerichteten Aktionen von PRL und Glucocorticoiden zeigen sich auch bei der im Verlauf einer Immunantwort folgenden Differenzierung von Lymphozyten. Glucocorticoide hemmen die PRL-Freisetzung und induzieren CD4<sup>+</sup>-Zellen in ihrer Differenzierung hin zum TH2-Zelltypus (Matera, 1997). PRL auf der anderen Seite bewirkt eine Ausdifferenzierung der T-Zellen hin zu den TH1-Zellen wie in Kapitel 2.3.2.1 beschrieben.

### **2.3.1.3 PRL und Transplantatabstoßung**

Bei organtransplantierten Patienten konnte man einen der Transplantatabstoßung vorangehenden PRL-Anstieg feststellen. Eine Verringerung des PRL-Spiegels durch den Dopamin-D<sub>2</sub>-Agonisten Bromocriptin reduzierte den Abstoßungsgrad wie Larson, Copeland & Russel bereits 1985 in einer Untersuchung festgestellt haben. Eine kombinierte Therapie aus Cyclosporin-A (CyA) und BCR nach Herztransplantation beim Menschen konnte eine akute Abstoßungsreaktion deutlich verzögern und die Infektionsrate senken (Ferrari, 1981). Ein möglicher Mechanismus dessen ist, dass CyA einen kompetitiven Gegenspieler zum PRL um die Bindung an den PRL-R auf den B- und T-Lymphozyten darstellt. (Reber, 1993). So führt eine Hyperprolaktinämie zur reduzierten Wirkung des immunsuppressiven CyA. Interessanterweise wurde diese kompetitive Hemmung durch CyA nur an Lymphozyten nachgewiesen, nicht jedoch an Rezeptoren der Milchdrüsen. Cardon et al. (in Reber, 1993) konnten in einer anderen Studie zeigen, dass CyA in einer Konzentration von 0,12-12 µg/100 g Körpergewicht, die PRL-Freisetzung stark stimuliert und dies zu einer Hyperprolaktinämie führt, was evtl. ein anderer Grund für die immunsuppressive Wirkung dieser Substanz ist.

Einen weiteren Gesichtspunkt erwähnt Reber (1993): Bei einer Transplantatabstoßung wurden erhöhte Spiegel des Zytokins IL-6 festgestellt. Wie bereits beschrieben führt IL-6 zu einer vermehrten PRL-Sekretion und somit zu erhöhten PRL-Serumspiegeln. Auch die Rezeptorhomologien dieser beiden Zytokine sprechen für eine gemeinsame Interaktion bei der Immunregulation.

In Versuchstieren, die hypophysektomiert wurden konnten Nagy et al. (zit. n. Weigent et al., 1996) eine verstärkte Abstoßung auf transplantierte Haut feststellen, nachdem sie PRL zugeführt hatten. Ebenso wurde bei diesem Versuchsansatz eine AK-Synthese gefördert. Die kombinierte Gabe von 2-Bromo- $\alpha$ -Ergokryptin (= CB-154), einem potenten D<sub>2</sub>-R Stimulator, mit CyA resultierte in nierentransplantierten Ratten in einer signifikanten Senkung der Transplantatabstoßung (Gala, 1991).

### **2.3.2 Wirkung von PRL und anderen Hormonen auf Zellen des Immunsystems**

In diesem Kapitel sollen die Leukozytenpopulationen, die in dieser Studie mit aufgenommen wurden, kurz charakterisiert werden. Im Speziellen wird hierbei auf endokrine Einflüsse eingegangen, insb. derjenigen von PRL, die das Aktivitätsniveau, die Proliferation, Migration und Chemotaxis der Zellen beeinflussen können. Es werden die Granulozyten mit den Populationen der Neutrophilen, der Eosinophilen und der Basophilen, danach die Gruppe der Monozyten /Makrophagen und schließlich die Lymphozyten mit der Unterteilung in B- und T-Zellen (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Zellen) besprochen. Der Vollständigkeit wegen wird noch auf die NK-Zellen eingegangen, auch wenn sie in dieser Studie nicht mit untersucht wurden.

PRL kann einen direkten Einfluss auf die Zellen des IS ausüben. Dies geschieht möglicherweise, wie bereits in Kapitel 2.2.5.5 beschrieben, über die von den Zellen exprimierten Rezeptoren. Dabei hängt die Anzahl der Rezeptoren, die ein Lymphozyt oder eine andere Zelle des IS exprimiert, u.a. vom umgebenden Gewebe (Lymphknoten, Knochenmark, Milz, etc. ) und vom Aktivierungsgrad der Zelle ab.

#### **2.3.2.1 Wirkung auf Granulozyten**

Granulozyten stellen mit etwa 60% den größten Anteil der Leukozyten im peripheren Blut dar. Sie lassen sich in drei Gruppen aufgrund ihrer unterschiedlichen Anfärbbarkeit einteilen: Neutrophile, Eosinophile und Basophile. Ihre Häufigkeit stellt sich folgendermaßen dar:

**Tabelle 8:** Prozentuale Verteilung (Mittelwert und 95-Perzentile) der Granulozyten im peripheren Blut in Gesunden (Abbas et al., 1996).

Granulozyt	% der Gesamtleukozyten	
	Mittelwert	95-Perzentile
Neutrophiler	55%	34,6-71,4%
Eosinophiler	3%	0-7,8%
Basophiler	0,5%	0-1,8%

Granulozyten gelangen nach ihrer Maturation im Knochenmark in die periphere Blutzirkulation, in der sie sich für ca. einen Tag aufhalten, bevor sie in die verschiedenen Gewebe migrieren und nicht mehr ins Blut zurückkehren. Die Eigenschaften und Funktionen der einzelnen Granulozyten werden im Folgenden dort erläutert:

#### a) Neutrophile Granulozyten (PMN-Zellen)

Die Neutrophilen sind mit 55-60% der größte Teil der Granulozytenfraktion. Sie bilden eine Gruppe differenzierter, nicht mehr teilungsfähiger Blutzellen, die sowohl die Fähigkeit zur Phagozytose als auch zur Fortbewegung besitzen. Sie entstehen im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen und werden schließlich als reife Endzellen, die die Fähigkeit zur weiteren Teilung verloren haben, an das Blut abgegeben. Die Entwicklungsdauer beträgt ca. 10 Tage, ihre Halbwertszeit im Blut 6-7 h, und die Überlebenszeit im Gewebe liegt bei 4-5 Tagen (Bundschuh et al., 1988).

Ihre Hauptfunktion besteht in der Chemotaxis und Phagozytose eingedrungener Mikroorganismen. Sie reagieren selbst heftig auf chemotaktische Substanzen, durch die sie mittels einer Vielzahl von Rezeptoren auf ihrer Oberfläche aktiviert werden. Sie sind die mobilsten Zellen aller Leukozyten.

Sucht man in der Literatur nach Hinweisen auf endokrin bedingte Einflüsse auf das Migrationsverhalten und ihre Anzahl im peripheren Blut, so findet man u.a. folgende Arbeiten:

- Koh, van Egmont, Zhuang et al. (1990) untersuchten die Zellzahlen in einer operationsbedingten Stresssituation unter Anästhesie mittels Akupunktur, die einen Anstieg der Catecholaminspiegel, des Cortisols und des PRL zur Folge hatte. Neben einem starken Anstieg der Lymphozyten stellten sie eine Reduktion des Anteils an Neutrophilen und Eosinophilen fest.
- Maes (1995) beschreibt in einem Übersichtsartikel Zusammenhänge der Major-Depression, des endokrinen und des Immunsystems. So ist die Depression durch ein verstärktes Aktivierungsniveau der HHN-Achse charakterisiert, begleitet von einer in vivo-Aktivierung des zellulären IS. Die Gabe von 1mg Dexamethason an diese Patienten führte zu Leukozytose, Lymphozyto- und Monozytopenie sowie zu einer Neutrophilie.
- Eine neue Studie aus Japan von Suzuki et al. (2000) untersuchte die Auswirkung eines Marathonlaufes auf die Konzentrationen verschiedener Substanzen, die aktivierend auf Neutrophile wirken, wie IL-6, IL-8, G-CSF, GH und Prolaktin bzw. mobilisierend wirken wie Cortisol, GH und G-CSF. In all den genannten Parametern fanden sie signifikant gesteigerte Werte. Leider machten sie keine Aussage bezüglich der Zahl der Neutrophilen im Blut.
- In einer in vitro-Studie untersuchten Fornari et al. (1995) das Migrationsverhalten von Neutrophilen bei Patienten mit chronischer Hyperprolaktinämie und verglichen

diese mit Neutrophilen gesunder Personen. Sie stellten eine verminderte Migration und eine reduzierte spontane Migration der Zellen der Patienten mit Hyperprolaktinämie fest. Sie schlossen auf einen direkten oder indirekten Effekt von PRL auf Migration und Chemotaxis der Neutrophilen.

Es zeigt sich somit tendentiell, dass ein Cortisolanstieg i.A. eher reduzierend auf die Zahl der Neutrophilen auswirkt und PRL hemmend auf die Migration zu wirken scheint.

Interessant ist weiterhin, dass sich auch Neuropeptide (bzw. „endogene Morphine“) an der Regulation der Migration beteiligen. Zu diesen Neuropeptiden zählen die Substanz P,  $\beta$ -Endorphin und met-Enkephalin. Diese können sowohl als Neurotransmitter und Neuromodulatoren als auch als Hormon wirksam sein. So konnten Opioid-Rezeptoren auf Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten nachgewiesen werden, die in der Modulation der Immunzellfunktion mit eingebunden sind (Harvath, 1992).

## **b) Eosinophile Granulozyten**

Eosinophile Granulozyten ähneln in ihrer Eigenschaften und ihrer Herkunft den o.g. Neutrophilen. Sie stehen jedoch in enger Beziehung zu allergischen und parasitären Erkrankungen. So können diese IgE-Rezeptor exprimierenden Zellen durch ihre toxischen Granula zusammen mit Makrophagen die Zerstörung von Parasiten bewirken. Außerdem treten Eosinophile bei allergischen Erkrankungen, wie dem Asthma bronchiale und chronischen Hauterkrankungen auf.

Eine hormonale Steuerung der Werte der Eosinophilen im Blut ist von verschiedenen Stoffen bekannt. So führen ACTH, Cortisol und Sympathomimetika zu einer Verminderung, Östrogene, Androgene,  $\beta$ -Rezeptorblocker, IL-3, IL-5 und GM-CSF zu einer Steigerung der Eosinophilenzahl im Blut. (Bundschuh et al., 1988, Czarnetzki, 1992, Silberstein, 1992)

In neueren Studien wurden ähnliche Ergebnisse gefunden:

- Levenson & Greenberg (1996) konnten eine Reduktion der Eosinophilen und Basophilen bei intranasaler Applikation von Corticosteroiden zeigen.
- Einen Effekt, der nicht näher erläutert wurde, fand sich nach wiederholter Anwendung von Hyperthermie durch 47<sup>0</sup>C heiße Bäder in einer reduzierten Zahl eosinophiler Granulozyten (Kubota et al., 1997) im Blut.
- In der o.g. „Operationsstress-Studie“ von Kho und Mitarbeitern (1990) stellte sich unter dem Anstieg von Catecholaminen, Cortisol und PRL ein verminderter Anteil an Eosinophilen ein.
- Mehrere Studien die eine stressinduzierte Reduktion von Eosinophilen berichten, konnte auch Wardlaw (1994) in seinem Übersichtsartikel aufzeigen. Auch psychi-

scher Examensstress bei jungen, gesunden Menschen hat die eben genannten Effekte auf die Eosinophilenzahlen (Malathi & Parulkar, 1992).

### **c) Basophile Granulozyten**

Diese zahlenmäßig kleinste Gruppe der Granulozyten sind als Effektorzellen der IgE vermittelten Überempfindlichkeitsreaktion zu sehen. Sie agieren dabei zusammen mit den ebenfalls IgE-Rezeptoren exprimierenden Mastzellen (Abbas et al., 1996).

Studien, die den endokrinen Einfluss auf diese Zellen untersuchen, gibt es sehr wenige. Hinweise gibt die bereits zitierte OP-Stressstudie von Kho (1990), bei der sich trotz eines Anstiegs von Cortisol, Catecholaminen und PRL keine Veränderung in der Zahl der basophilen Granulozyten fand. Unter lokalen Bedingungen konnte eine Reduktion der Zahl nach intranasaler Steroidapplikation gezeigt werden (Levenson & Greenberg, 1996).

### **2.3.2.2 Wirkung auf Monozyten**

Monozyten stellen nach den Neutrophilen und Lymphozyten die drittgrößte Gruppe der Leukozyten dar. Der prozentuale Mittelwert liegt bei 6,5%, die 95-Perzentile bei 2,4-11,8% der Leukozyten. Monozyten (im Blut) und Makrophagen (im Gewebe) gehören zum mononukleären, phagozytären System. Sie entstehen im Knochenmark aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle mit den Granulozyten und gelangen als Monozyten in den Blutstrom. Nachdem sie den Blutstrom erreicht haben, bilden sie etwa je zur Hälfte einen marginalen und einen zirkulierenden Pool. Sie haben eine relativ lange Halbwertszeit im Blut von ca.1-3 Tagen. (van Furth, 1992; Pabst & Binns, 1992). Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Migration gelangen sie ins Gewebe (Histiozyt/ Makrophage) und können sich dort weiter differenzieren. Hauptaufgaben bestehen in der Phagozytose, der Kooperation mit den Lymphozyten, der Abwehr von virusinfizierten- und Tumorzellen. Während einer akuten Entzündung kann ihre Zahl auf das 1,5-2-fache ansteigen, die Halbwertsverweildauer im Blut auf 12 h absinken (van Furth, 1992).

Es lassen sich u.a. folgende Hinweise auf endokrine Regulation der Monozyten aus der Literatur eruieren:

- Alle Monozyten/Makrophagen tragen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren für das Hormon Prolaktin (s.dazu Tabelle 7 und Kap. 2.2.5.2.2).
- Wie bei Weigent et al. (1996) beschrieben, führt eine defekte PRL-Sekretion (beispielsweise durch BCR hervorgerufen) zu einer Suppression der tumorvernichtenden Eigenschaften der Makrophagen. Dieser Effekt ist durch die exogene Zufuhr von PRL reversibel.

- Makrophagen werden insbesondere durch die Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  aktiviert, die wiederum von stimulierten TH1-Zellen produziert und sezerniert werden (Pichler et al., 1996). In vivo mit BCR behandelte Mäuse zeigten eine beeinträchtigte Funktion der Makrophagen, was vor allem auf einen Mangel an von TH1-Zellen produziertem IFN- $\gamma$  zurückzuführen ist, da TH1-Zellen wiederum durch PRL stimuliert werden können (Yu-Lee, 1997; Pichler et al., 1996). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Matera et al. (1997) bei hypophysectomierten Ratten, die kein PRL mehr produzieren konnten.
- Bei Untersuchungen am Menschen konnte an der bereits o.g. Gruppe von Patienten mit Major-Depression und aktivierter HHN-Achse (Maes, 1995) nach Gabe von Dexamethason eine Monozytopenie festgestellt werden.
- Wiederholte Anwendung von Hyperthermiestress hat nach Kubota et al. (1997), einen Anstieg der Monozyten zur Folge, jedoch wurden dabei keine endokrinen Parameter bestimmt, mit denen die Veränderung in Zusammenhang gebracht werden könnte.

Daneben stellen auch verschiedene Neuropeptide / endogene Opioide (wie bereits bei den Neutrophilen beschrieben) einen Faktor für die Migration und Chemotaxis der Monozyten dar. Zu diesen Neuropeptiden zählen die Substanz P,  $\beta$ -Endorphin und met-Enkephalin (Harvath, 1992). Darauf wird in der Diskussion im Kapitel 5.7 noch einmal genauer eingegangen.

### **2.3.2.3 Wirkung auf Lymphozyten**

Die zweitgrößte Gruppe der Leukozyten wird von den Lymphozyten gebildet. Sie treten mit einer durchschnittlichen Zahl von 35 % der Leukozyten auf (95-Perzentile: 19,6-52,7%). Lymphozyten sind die Träger der spezifischen Abwehr des Organismus im Gegensatz zu den zuvor besprochenen Zellen.

Native Lymphozyten sind B- und T-Zellen, die im Knochenmark bzw. Thymus gereift sind, aber noch keinen Antigenkontakt hatten. Ihr Aufenthaltsort wechselt fortwährend zwischen Blut und peripherem lymphatischem Gewebe. Über spezielle adhäsive Mechanismen an den Kapillaren gelangen sie vom Blut in die Gewebe, indem sie durch das Endothel hindurchwandern (=Extravasation). Über die Lymphgefäße gelangen die Lymphozyten zurück in den Blutkreislauf. Kommt es zu einer Infektion, so bringen phagozytierende Zellen Antigenmaterial in die Lymphknoten, wo es zur Proliferation und Aktivierung der entsprechenden Lymphozyten kommt. Diese gelangen daraufhin in verstärktem Maße über die efferenten Lymphgefäße zurück ins Blut und können somit an den Ort der Infektion transportiert werden (Janeway & Travers, 1997, pp. 8-9).

**Tabelle 9:** Aufteilung der Lymphozyten in ihre wichtigsten Subpopulationen mit Angaben zur Funktion, der wichtigsten Oberflächenzellmarker und ihrer Häufigkeit im peripheren Blut bei gesunden Menschen (Abbas, 1996; Braun, 1996). Angaben über Häufigkeit von PRL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche sind Tab. 7a) und 7b) zu entnehmen.

Lymphozyt		wichtigste Funktion	wichtige Zell-Marker	%-Lymphozytengehalt
B-Lymphozyten		Antikörperproduktion	CD19 <sup>+</sup> , CD20 <sup>+</sup>	8-15%
T-Lymphozyten	T-Helferzelle	Proliferation u. Differenzierung von B-Zellen	CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>-</sup>	40-60%
	zytotoxische / Suppressor-Zelle	Lyse virusinfizierter und Tumorzellen	CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>-</sup> , CD8 <sup>+</sup>	20-35%
NK-Zellen		Lyse virusinfizierter und Tumorzellen	CD16 <sup>+</sup> , CD56 <sup>+</sup>	5-10%

Sie bilden klar unterteilbare Klassen mit unterschiedlichen Funktionen und Proteinproduktionen, obwohl morphologisch kaum ein Unterschied besteht. Die Einteilung in B- und T-Lymphozyten veranschaulicht folgende Tabelle 9:

#### 2.3.2.3.1 Wirkung auf T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten reifen, nachdem Stammzellen aus der fetalen Leber und dem Knochenmark in den Thymus eingewandert sind, in diesem heran. Dabei spalten sich sehr früh die NK-Zellen ab, die als eigene Lymphozytensubpopulation anzusehen sind und später besprochen werden. Die Einteilung der T-Lymphozyten in einzelne Subpopulationen erfolgt aufgrund unterschiedlicher T-Zell-Rezeptoren (TCR), unterschiedlicher Antigenerkennung sowie Zytokinsekretion in T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) und T-Suppressorzellen/zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>). Bei den CD4<sup>+</sup>-Zellen werden noch die TH1- und TH2-Zellen unterschieden, worauf hier jedoch nur kurz in Zusammenhang mit PRL eingegangen wird.

PRL scheint einen Einfluss bei der Differenzierung von T-Helferzellen hin zum TH1-Zelltyp zu besitzen (Matera, 1997). Diese Hypothese erfährt Unterstützung durch die Fähigkeit von PRL, die Synthese von IFN- $\gamma$  sowie IL-2 zu induzieren (Matera, 1997), und passt zu der Feststellung, dass es als „Gegenspieler“ zu den Glucocorticoiden (s. Kap. 2.3.1.2) fungiert, da diese die Ausdifferenzierung einer T-Helferzelle in Richtung einer TH2-Zelle dirigieren. Eine Hyperprolaktinämie spielt ebenfalls bei der

Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine Rolle (s. Kapitel 2.3.4), was sich bei solchen Patienten in einer Verschiebung hin zum TH1-Profil bemerkbar macht (Pichler, Peter & Hänsch, 1996; Romagnani, 1996).

Wie bei IFN- $\gamma$  und IL-2 reguliert PRL auch die Gentranskription in T-Zellen für IRF-1, ein Zytokin, das u.a. für die Aktivierung der NK-Zellen eine wichtige Funktion besitzt (Weigent et al., 1996; Matera, 1997).

Die Fähigkeit einer T-Zelle, auf einen Antigenstimulus zu reagieren, hängt von der PRL-Präsenz ab, wie Hiestand et al. bereits 1986 zeigen konnten. Eine Reduktion von PRL im Serum führt zu einer verringerten Antwort der T-Lymphozyten auf einen Stimulus der durch ein Antigen ausgelöst wurde. Dies konnte bei Ratten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden. Auch eine Wirkung auf die Proliferation der T-Zellen durch PRL ist mehrfach beschrieben. So hat die Anwesenheit von PRL einen positiven Effekt auf die Proliferation, während die Zugabe von PRL-AK die Proliferation hemmt (Weigent et al., 1996).

Bezüglich der Einflussnahme von PRL auf T-Zellen *in vivo* gibt es ebenfalls einige Hinweise. Eine BCR-Behandlung führte zu einer reduzierten IFN- $\gamma$ -Produktion von Lymphozyten, was durch exogene PRL-Zufuhr voll reversibel ist (Matera, 1997).

Auch die alleinige Gabe von PRL zeigt bei normalen Tieren eine Zunahme der IL-2-Rezeptoren auf CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen in nicht stimulierten peripheren LK. Diese Rezeptorexpression blieb bei Tieren mit einem Gendefekt für HVL-Hormone aus. Die alleinige PRL-Substitution zeigte keinen kompensatorischen Effekt, was dafür spricht, dass auch andere HVL-Hormone einen direkten oder auch indirekten Einfluss auf die Immunfunktion des Organismus ausüben (Weigent et al., 1996).

Auch innerhalb der Gruppe der Lymphozyten konnten Interaktionen mit den endogenen Opioiden, die sowohl als zentral wirksame Substanzen als auch als Neuro-Hormone gelten, nachgewiesen werden. So wirken sich  $\beta$ -Endorphin und met-Enkephalin inhibitorisch auf die Motilität der T-Lymphozyten aus (Harvath, 1992).

*In vivo*-Studien am Menschen sind deutlich geringeren Ausmaßes. Giglio, Imro Filaci et al. (1994) untersuchten die prozentuale Zusammensetzung der zirkulierenden Lymphozyten im Blut an Frauen in verschiedenen Stadien der Menopause. Diese Stadien zeichneten sich durch veränderte Sexualhormonspiegel aus. Sie kamen zu folgendem Ergebnis: Die Zahl der CD2<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen korrelierten positiv mit den LH- und negativ mit den FSH-Spiegeln im Serum. Weiterhin zeigten postmenopausale Frauen signifikant niedrigere prozentuale Anteile an CD4<sup>+</sup>-Zellen und höhere prozentuale Anteile an CD8<sup>+</sup>-Zellen im Blut als gleichaltrige Frauen, die sich noch nicht in der Menopause befinden. PRL beeinflusste die Zahl der CD2<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>-Zellen positiv. Zusammenfassend sehen die Autoren Zusammenhänge im erhöhten

FSH- und verminderten PRL-Spiegel und den reduzierten Zahlen an CD4+-Zellen und B-Lymphozyten (s. dort).

Köller, Kotzmann und Clodi (1997) betrachteten die Immunzellphänotypen bei Patienten mit einer Hyperprolaktinämie. Sie stellten dabei einen erhöhten CD4/CD8-Quotienten verglichen mit einem gesunden Kollektiv fest. Nach einer zweiwöchigen Behandlung mit Dopaminagonisten (BCR), um die gesteigerten PRL-Spiegel zu senken, stellten sie jedoch weiterhin einen hohen Quotienten fest und gehen somit nicht von einer Korrelation zwischen PRL und dem CD4/CD8-Verhältnis aus. Sie konnten ebenfalls an diesem Patientenkollektiv keinen Unterschied zwischen den prozentualen Anteilen der T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) vor und nach der PRL-senkenden BCR-Therapie feststellen. Genauso wenig konnten sie einen signifikanten Unterschied zu einem gesunden Kollektiv mit normalen T-Zellwerten feststellen.

Bei einer Untersuchung der Aktivität der Lymphozyten stellte die Gruppe um Yu-Lee (1997) fest, dass eine Behandlung mit Bromocriptin (DA-Agonist) einen supprimierenden Effekt auf die B- und T-Zellaktivität hat, die Aktivität der CD8<sup>+</sup>-Zellen wird jedoch induziert.

In einer Untersuchung von Hennig, Becker und Netter (1996) zur serotonergen Stimulatuion von Lymphozyten an gesunden Probanden ergab sich nach einmaliger Gabe des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten Ipsapiron versus Placebo ein signifikanter Abfall der CD4<sup>+</sup>-Zellen. Gleichzeitig korrelierte dieser Abfall mit einem Ipsapiron induzierten Anstieg von Cortisol.

#### 2.3.2.3.2 Wirkung auf B-Lymphozyten

B-Lymphozyten (CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>-Zellen) entwickeln sich primär antigenunabhängig im Knochenmark, später kommt es zur weiteren antigenabhängigen Ausdifferenzierung in den peripheren lymphoiden Organen, insbesondere in den Lymphknoten, die sie auf dem Blutweg und durch Migration erreichen (Pichler et al., 1996). Sie besitzen die Fähigkeit zur „Rezirkulation“, d.h. sie können von den lymphatischen Organen wieder auf dem Weg über das lymphatische System in die periphere Blutzirkulation gelangen und von dort mittels Migration wieder in andere Gewebe abwandern. Im Knochenmark werden im Vergleich extrem viele Zellen gebildet, was je nach Aktivierungszustand Werte von 150 Milliarden B-Zellen pro Tag erreichen kann (Gimble et al, 1992), so dass hohe Turnover-Raten erreicht werden können.

Die Effekte von PRL auf die Aktivierung und Differenzierung von humanen B-Lymphozyten wurden ausführlich von Lahat et al. untersucht (Lahat, Miler, Shtiller & Touby, 1993). Dabei wurden B-Zellen entweder mit Anti-IgM-AK bzw. mit Anti-IgM-

AK plus IL-2 aktiviert. Die Zugabe von PRL bewirkte eine signifikante Zunahme der Expression von IL-2-Rezeptoren nach IL-2 Stimulation auf der Zelloberfläche. PRL zeigte bei B-Zellen, die mit Anti-IgM und IL-2 stimuliert wurden, einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Freisetzung von IgM und IgG. Auch in Abwesenheit von exogenem IL-2 konnte dieser glockenförmige Effekt der PRL-Konzentration auf die Aktivierung von B-Lymphozyten bestätigt werden. So konnte ein aktivierender Einfluss bei einer PRL-Konzentration von 0,2-10 ng/ml und ein hemmender bei Werten von 100ng/ml festgestellt werden. Diese Befunde sprechen für einen immunmodulatorischen Einfluss des PRL bei B-Lymphozyten, wie er auch schon länger bei den T-Lymphozyten bekannt ist. Ebenso kommt hier der synergistisch mit dem PRL wirkende Effekt von IL-2 zum Tragen (Lahat, Miler, Shtiller & Touby, 1993).

Auch die B-Lymphozyten unterliegen einer gewissen Beeinflussung durch zentrale Neuro-Peptide. So wirken sich  $\beta$ -Endorphin und met-Enkephalin aktivierend auf die Motilität der B-Lymphozyten aus (Harvath, 1992).

In vivo konnte gezeigt werden, dass bei Versuchstieren, die ein Defizit an HVL-Hormonen aufwiesen, eine Reduktion der Zahl der B-Zellen in peripheren LK auftrat (Weigent et al., 1996) sowie eine vermindererte AK-Produktion nach dem Kontakt mit Schaferythrozyten oder Lipopolysacchariden (Matera, 1997). Dieser Mangel konnte durch die alleinige Gabe von PRL nur teilweise ausgeglichen werden, woraus geschlossen werden kann, dass noch weitere Einflussgrößen eine Rolle spielen.

Während eine Bromocriptin (BCR)-Behandlung einen supprimierenden Effekt auf die B- und T-Zellaktivität hat, wird die Aktivität der CD8<sup>+</sup>-Suppressorzellen induziert (Yu-Lee, 1997).

Neuere *in vivo*-Studien, die die Zusammenhänge zwischen dem PRL-Spiegel und der Anzahl der Immunzellen untersuchten, sind in der Gynäkologie zu finden. Zimmer, Garza, Butte et al. (1998) betrachteten den prozentualen Anteil mütterlicher B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) post partum unter den Bedingungen des Stillens, was mit einer erhöhten PRL-Konzentration i.S. einhergeht. So zeigte sich ein reduzierter prozentualer Anteil an CD19<sup>+</sup>-Zellen, der mit den hohen PRL-Werten negativ korrelierte.

Zu scheinbar widersprüchlichen Ergebnissen kamen Imro, Filaci et al. (1994) bei der Untersuchung der Leukozytenzahlen, wie sie bei prä- und postmenopausalen Frauen auftreten. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme der Gesamtleukozyten, wobei hauptsächlich die B-Zellen betroffen waren. Sie folgern aus ihren Studien, dass ein erhöhtes FSH und gleichzeitig erniedrigtes PRL mit einer Reduktion der B-Lymphozyten zusammenhängen.

Köller et al. (1997) konnten in einem Patientengut mit erhöhten PRL-Werten nach einer zweiwöchigen prolaktinreduzierenden Therapie mit DA-Agonisten keinen Unterschied zwischen den prozentualen Anteilen der B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) vor und nach der PRL-senkenden BCR-Therapie feststellen. Ebenso konnten sie keinen signifikanten Unterschied zu einem gesunden Kollektiv mit normalen B-Zellwerten feststellen.

Aus diesen Studien wird deutlich, dass neben PRL auch andere Sexualhormone Auswirkungen auf die Anzahl der zirkulierenden Immunzellen besitzen.

#### **2.3.2.4 Wirkung auf die Aktivität von NK-Zellen**

Der *in vitro* Einfluss von PRL auf NK-Zellen wurde von vielen Arbeitsgruppen mit teils widersprüchlichen Ergebnissen untersucht. Matera et al. (Matera, 1997) stellten eine supprimierte NK-Aktivität von PBMC fest, die 16 Stunden mit pharmakologischen Dosen von 100-200 ng/ml PRL inkubiert wurden, was dem 10-20 fachen des physiologischen PRL-Spiegels entspricht. Jedoch wurden aufgereinigte NK-Zellen stimuliert durch leicht erhöhte physiologische PRL-Werte (12-25 ng/ml). Die durch PRL stimulierten NK-Zellen (PAK) erreichten unter serumfreien Bedingungen eine gleichwertige Zytotoxizität wie unter optimalen Bedingungen nach der Inkubation mit IL-2 (Cessano, Oberholzner & Contarini, 1994).

PRL stimuliert nicht nur die NK-Zellen sondern unterstützt zusätzlich deren Ansprechen auf IL-2. Dieser synergistische Effekt mit leicht erhöhten PRL-Konzentrationen zeigte sich sowohl in PBMC, als auch in aufgereinigten NK-Zellen im Angriff gegen Leukämie- oder Non-Hodgkin-Burkitt-Lymphom-Zellen (Matera, 1997). Eine Erhöhung auf das 10-fache der physiologischen PRL-Spiegel hemmte sowohl die Entwicklung der LAK-Aktivität, als auch die Proliferation von NK-Zellen nach IL-2 Aktivierung (Cessano et al., 1994).

Die Stimulation der NK-Zellen durch PRL erklärt man sich heute durch den aktivierenden Effekt auf den IRF-1 Transkriptionfaktor (Yu-Lee, 1997), der in der Erlangung der Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber virusbefallenen Zellen durch IFN von entscheidender Bedeutung ist (Matera, 1997).

Die Hemmung unter hohen PRL Konzentrationen (>75ng/ml und mehr) wird u.a. mit einer Down-Regulation der Rezeptoren erklärt (Matera, 1997). Nach einer 3 stündigen Inkubationszeit frisch isolierter Lymphozyten mit 100 ng/ml PRL konnten Matera (1997) und Cesano et al. (1994) eine 50%ige Reduktion der PRL-R mit Hilfe der <sup>125</sup>I-Methode und Flowzytometrie feststellen. Auch eine Behinderung der Signaltransduktion durch Bildung von monomeren [PRL]-[PRL-R]-Komplexen ist hierbei vorstellbar, wie man es aus der Gruppe der GH/PRL-Rezeptorfamilie kennt (Matera, 1997).

Wie bereits im Abschnitt über die *in vitro* Effekte von PRL beschrieben, zeigen auch die *in vivo* Experimente mit deutlich erhöhten PRL-Spiegeln einen immunsuppressiven Einfluss auf die Aktivität der NK-Zellen, obwohl auch hier die Datenlage nicht ganz einheitlich zu sein scheint. Mehrere Arbeitsgruppen (Matera, 1997) untersuchten bei Nagern die Auswirkungen auf das zelluläre IS nach der Zerstörung des tuberoinfundibulären dopaminergen Systems, was zu einer unkontrollierten PRL-

Freisetzung führte. Die Folgen bei Nager waren ein erhöhtes Tumorwachstum bei gleichzeitiger Hemmung der spontanen NK-Zytotoxizität zeigten. Jedoch belegten die Untersuchungen von Bellurado et al. (in Matera, 1997), dass ein Tumorwachstum unabhängig vom PRL-Spiegel im Serum war.

Auch beim Menschen liegen ähnliche Untersuchungen mit scheinbar widersprüchlichen Ergebnissen vor. Gerli, Rambotti, Nicoletti & Orlandi, (1986) konnten eine verminderte Aktivität von NK-Zellen bei Frauen mit einer Hyperprolaktinämie aufzeigen. Nach einer Behandlung mit dem Dopamin-Agonisten BCR normalisierte sich die Anzahl und die Funktion der NK-Zellen. Auf der anderen Seite konnten diese Ergebnisse von Matera et al. (1997) nicht bestätigt werden (Matera, 1997).

1996 konnten Matera et al. in frisch isolierten NK-Zellen eine 24-kDa PRL Form nachweisen, gleichzeitig wurde aber keine mRNA dieser PRL-Form in den Zellen gefunden. Dieses PRL könnte somit dem 23,5 kDa PRL des HVL entsprechen, das durch die NK-Zellen aus dem zirkulierenden PRL-Pool aufgenommen wurde. Die kontinuierliche Stimulation der NK-Zellen durch physiologische PRL-Konzentrationen könnte in vivo auf diesem Weg funktionieren (Materna, Bellone & Lebrun, 1996).

Wie in Kapitel 2.2.2.3 bereits beschrieben, führt akuter Stress zu einem Anstieg der PRL-Konzentration. Schedlowski et al. beschreiben einen Anstieg der Zahl der peripheren NK-Zellzahl im Zusammenhang mit einem akuten psychischem Stressereignis (Schedlowski et al., 1993), ohne jedoch andere Stresshormone (z. B. Noradrenalin) zu berücksichtigen. Auf der anderen Seite kommt es bei chronischem Stress sowohl zu einer Verringerung der Serum-PRL-Spiegel als auch der NK-Zellen. Eine in vitro erzeugte Hyperprolaktinämie führt, wie bereits beschrieben, zu einer Einschränkung der NK-Zellfunktion. All diese Befunde sprechen für einen Zusammenhang zwischen PRL, NK-Zellen, Stress und Immunsuppression (Matera, 1997).

### **2.3.3 Die Rolle von extrahypophysärem (lymphozytären) PRL für die Immunregulation**

In diesem Kapitel soll nur auf das von Immunzellen produzierte extrahypophysäre PRL eingegangen werden, das in der Literatur bisweilen auch als „Prolaktin-like-protein“ bezeichnet wird, aber von der Struktur her dem hypophysären Hormon entspricht. Die Funktion dieses lymphozytären PRL ist noch weitgehend unbekannt und ist weiterhin Gegenstand der Forschung.

Wie bereits im Kapitel 2.2.4 näher erläutert, besitzen Lymphozyten in stimuliertem Zustand die Fähigkeit, bioaktives PRL zu synthetisieren, das in etwa dem hypophysären PRL entspricht. Untersuchungen auf RNA-Ebene zeigten, dass nur T-Lym-

phozyten in der Lage sind, eigenes PRL zu synthetisieren (Clevenger, Freier & Kline, 1998). Allerdings zeigen frisch isolierte, unstimulierte T-Zellen keine PRL-m-RNA, erst die Stimulation mit einem Mitogen führt zur Expression der entsprechenden mRNA. Daneben besitzen auch noch stimulierte NK-Zellen die Potenz zur Synthese von PRL (Matera, Bellone & Contarini, 1992).

Nagy und Berczi (1991) konnten zeigen, dass nach Hypophysektomie immer noch minimale Serum-Prolaktinspiegel nachweisbar waren, was für deren extrahypophysären Ursprung spricht. Erst nach Behandlung mit PRL-Antikörpern konnte kein freies PRL mehr gefunden werden. Die Beseitigung von hypophysärem *und* extrahypophysärem PRL führte zur tödlichen Schwächung des lymphohämatopoetischen Systems (Nagy & Berczi, 1991). Nach Matera spricht diese Feststellung für eine Bestätigung der These, dass extrahypophysäres PRL u.a. eine kompensatorische Rolle von hypophysärem PRL einnehmen kann (Matera, 1997).

Die Rolle des PRL als auokrines bzw. parakrines Agens konnte ebenfalls in Experimenten mit Anti-PRL-AK demonstriert werden. Die Proliferation von humanen T-Zellen durch die Mitogene ConA oder PHA wird durch Anti-PRL-AK blockiert, auch eine IL-2/IL-4 abhängige Zelllinie konnte dadurch inhibiert werden (Hartmann, Holaday & Brenton, 1989).

Wie von vielen Arbeitsgruppen bestätigt, induziert PRL die IL-2 Rezeptoren auf Lymphozyten und stimuliert (indirekt) T-Zellen zur Proliferation (Weigent et al., 1996).

Mehrere Zelllinien (z.B. die Lymphomzellen *sfr*Ramos oder die humanen Jurkat-T-Leukämiezellen) benötigen dieses endogene PRL für ihr Wachstum (Matera, 1997). Bernton et al. gehen davon aus, dass das „prolactin-like protein“ in der Zelle für den Übergang von der G<sub>1</sub> –in die S-Phase nötig wird (Bernton et al., 1991).

Auch Matera et al. (1996) untersuchten in PRL-freiem Serum die Aktivität von LAK-Zellen, die durch IL-2 stimuliert wurden, und konnten eine verminderte Aktivität nach Zugabe von PRL-AK feststellen.

Hatfill et al. (Zit. n. Gala, 1991) berichten, dass bei 57% der Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) ein erhöhter Serum-PRL-Wert festgestellt werden konnte. In dem Zellysat aus den gereinigten Leukämiezellen konnte PRL nachgewiesen werden, sodass die Autoren vermuten, dass die erhöhten Spiegel aus den AML-Zellen stammen könnten.

Die Regulation der Sekretion dieses lymphozytären PRL unterliegt aber, wie bereits weiter oben besprochen, nicht den typischen Regulationsfaktoren, wie sie für laktotrope Zellen des HVL gelten. Diese Einflussfaktoren bedürfen noch der weiteren Forschung, neben der exakten Abgrenzung der Frage welche Immunzellen in welchem Stadium ihrer Reifung fähig sind PRL zu produzieren. Auch das Zusammenspiel von extrahypophysärem, lymphozytärem und hypophysärem PRL bei der Wirkung auf die Immunfunktion ist bisher nur sehr bruchstückhaft charakterisiert.

### **2.3.4 Hyperprolaktinämie und Autoimmundefekte**

Die meisten Autoimmunerkrankungen haben bei Frauen eine höhere Inzidenz als bei Männern, was den Schluss zulässt, dass dabei auch ein Sexual- und Fortpflanzungshormon eine Rolle spielen kann (Gala, 1991). Rechnet man dazu auch das PRL, das bei Frauen höhere Serumspiegel aufweist, so wurden tatsächlich hohe PRL-Serumspiegel in Zusammenhang mit autoimmunologischen Störungen gebracht. Walker et al. (1993) haben sich ausführlich mit diesem Thema beschäftigt. Bisher konnten folgende Autoimmunerkrankungen mit einem erhöhtem PRL Serumspiegel in Zusammenhang gebracht werden (Yu-Lee, 1997; Reber, 1993):

- Systemischer Lupus erythematoses (SLE)
- Autoimmunuveitis
- Autoimmune Schilddrüsenerkrankung
- Multiple Sklerose
- Adjuvante Arthritis als tierexperimentelles Korrelat der rheumatoiden Arthritis
- Allergische Enzephalomyelitis als tierexperimentelles Korrelat der multiplen Sklerose
- Juvenile rheumatoide Arthritis
- Psoriasis Arthritis

Daneben wurden auch hohe PRL-Spiegel bei Patienten mit einer asymptomatischen HIV-Infektion festgestellt (Yu-Lee, 1997).

Die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge bei Hyperprolaktinämie und Autoimmunerkrankung sind noch nicht aufgedeckt. Ein Mechanismus, der diese Zusammenhänge unterstützt, ist die Tatsache, dass in Mäusen eine verstärkte Expression von m-RNA der Interleukine 4 und 6 in Milzzellen bei Hyperprolaktinämie gefunden wurde. IL-4 und IL-6 wiederum sind für das Wachstum, die Differenzierung der B-Zellen, sowie die Produktion von IgM und IgG wichtig (Weigent et al., 1996).

Tatsächlich konnten McMurray et al. (in Clevenger, Freier & Kline, 1998) zeigen, dass ein vermehrte Aktivität im Krankheitsbild des SLE mit einer erhöhten PRL-Konzentration einhergeht. La Valle et al. (in Reber, 1993) konnten an sieben von acht unbehandelten SLE-Patienten erhöhte PRL-Spiegel messen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (16,0 ng/ml versus 4,3 ng/ml). Daneben geht eine Behandlung des SLE mit Bromocriptin mit einer Verbesserung des Krankheitsbildes einher. Eine Verbesserung unter einer BCR-Therapie wird auch von Yu-Lee (1997) bei autoimmuner Uveitis und Psoriasis-Arthritis beschrieben. So zeigten 28 von 35 BCR-behandelten Patienten mit Psoriasis Arthritis eine klinische Besserung ihres Krankheitsbildes in einer Studie von Weber et al. (zit. n. Reber, 1993). Hender &

Bynke (zit. n. Reber, 1993) konnten eine Verbesserung der Uveitis/Iridozyklitis bei Patienten, die mit BCR behandelt wurden, nachweisen. Bessere Ergebnisse konnten dabei mit einer kombinierten Therapie aus niedrig dosiertem Cyclosporin-A und BCR erzielt werden.

Die Frage, ob bei einer Hyperprolaktinämie im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen das PRL hypophysären Ursprungs ist oder extrahypophysär produziert wird, stellt sich folgerichtig. Allerdings sprechen tierexperimentelle Ergebnisse eher für einen hypophysären Ursprung der erhöhten PRL-Werte (Nagy & Berczi, 1991). Dafür spricht auch die Besserung unter einer Behandlung mit BCR.

## 2.4 Ableitung der Fragestellungen

In dieser psychoneuroimmunologischen Studie sollen einige Aspekte des Zusammenspiels von endokrinem System, Immunsystem und dem Neurotransmittersystem des ZNS an einer konkreten Provokationsstudie beleuchtet werden. Während sich andere Arbeiten unserer Gruppe primär auf die psychischen und persönlichkeitsassoziierten endokrinen Reaktionen beziehen, will diese Arbeit als Schwerpunkt den Zusammenhang zwischen endokrinen und immunologischen Veränderungen untersuchen, wie sie nach einer serotonergen Stimulation durch den zentral wirksamen Serotonin-Releaser und –Reuptakeinhibitor dex-Fenfluramin auftreten. Folgenden Fragestellungen soll nun näher nachgegangen werden:

### 1. Der Einfluss einer serotonergen Stimulation durch dex-Fenfluramin auf die Stimulation der PRL-Sekretion

In der Literatur gibt es einige Studien, die einen Anstieg des hypophysären Hormons Prolaktin nach Stimulation mit serotonerg wirkenden Substanzen zeigen konnten (siehe Tabelle 28 im Kapitel 5.1). Es wurden dabei selektive 5-HT-Agonisten oder auch unspezifische Agonisten bzw. indirekt agonistisch wirkende Substanzen verwendet, wie sie im Kapitel 2.2.2.1 erwähnt wurden. In unserem Versuchsdesign verwendeten wir dazu den Serotonin-Reuptake-Inhibitor und –Releaser dex-Fenfluramin, der im Kapitel 3.3 genauer charakterisiert wird, da er die klarsten Bezüge zu klinischen Diagnosen erkennen ließ, die in den beteiligten Diplomarbeiten relevant waren.

Die meisten Studien untersuchten die Effekte jedoch meist nur an einer sehr geringen Probandenzahl (im Schnitt 10-12 Versuchsteilnehmer). Desweiteren wurde die Homogenität der Gruppen z.T. durch die gleichzeitige Teilnahme von weiblichen und männlichen Studienteilnehmern eingeschränkt. Außerdem lagen nicht in allen Untersuchungen Placebokontrollen vor.

Alle Studien, die bisher die serotonergen Effekte auf andere endokrine Parameter untersuchten und dabei dex-Fen gebrauchten, verwendeten vergleichsweise hohe Einzeldosen von 30-60 mg dieser Substanz bzw. das Racemat d-l-Fenfluramin.

Wir wollten nun in unserem Versuchsdesign sowohl eine ausreichend hohe Probandenzahl bei gleichzeitiger intraindividuell Placebokontrolle heranziehen, als auch eine niedrige d-Fen Einzeldosis verabreichen, um die Nebenwirkungen, die regelmäßig bei den höheren Dosierungen auftreten, zu vermeiden. Es soll ein PRL-Anstieg erreicht werden, aber dabei sollen keine störenden Nebenwirkungen die Versuchsbedingungen beeinflussen.

**Frage 1:** Kann ein signifikanter PRL-Anstieg nach Gabe von nur 15 mg des 5-HT-Releasers / -Reuptakeinhibitors dex-Fenfluramin bei gesunden männlichen Probanden erreicht werden ?

## **2. Der Einfluss der serotonergen Stimulation durch dex-Fenfluramin auf die Cortisolsekretion**

Die in Kapitel 5.1.2 aufgezählten Untersuchungen zeigten fast alle neben einem PRL-Anstieg auch einen Anstieg von Cortisol. Da wir in dieser Untersuchung u.a. die Wirkung von PRL auf das Immunsystem untersuchen wollen, würde sich ein gleichzeitiger Anstieg von Cortisol durch seine eigenen immunmodulierenden Eigenschaften nur störend auswirken. Ziel soll es deshalb sein, diesen Cortisolanstieg und somit mögliche steroidbedingte Einflüsse auf immunologische Parameter in unserer Untersuchung zu vermeiden.

**Frage 2:** Kann bei der niedrigen Dosierung von 15 mg dex-Fenfluramin ein (signifikanter) Cortisolanstieg vermieden werden?

## **3. Der Einfluss der serotonergen Stimulation durch dex-Fenfluramin und einer damit einhergehenden PRL-Erhöhung auf die Immunzellmigration im peripheren Blut**

Eine zahlenmäßige Veränderung der Leukozyten bzw. eine prozentuale Verschiebung innerhalb ihrer Subpopulationen ist im betrachteten Zeitfenster von ca. 4 Stunden auf die ständige Migration bzw. Emigration der Leukozyten und deren Untergruppen zurückzuführen. Diese kontinuierlich stattfindende Bewegung von Leukozyten von primär und sekundär lymphatischem Gewebe über die Lymphbahnen in die Peripherie, also in die Blutzirkulation, aber auch die Migration der Zellen aus der Blutstrombahn durch das Kapillarendothel zurück ins umliegende Gewebe bzw. die lymphatischen Organe sind hauptverantwortlich für diese relativ raschen Veränderungen der Präsenz der Leukozyten im Blut. Veränderungen können so innerhalb der zirkadianen Rhythmik ständig beobachtet werden.

Einflüsse von Substanzen mit endokriner Wirkung spielen dabei eine wichtige Rolle und können hier als Bindeglied zwischen den Abläufen im ZNS und den daraus resultierenden Auswirkungen auf Immunzellen agieren. Wie der Literatur zu entnehmen ist und dies auch im Kapitel 2.3.2 dargestellt ist, haben viele ZNS-assoziierte Stoffe und Hormone, zu denen auch das PRL zählt, u.a. einen direkten, rezeptorvermittelten Einfluss auf die einzelnen Immunzellen und deren Aktivität. Da aber bei einer kompletten Betrachtung des Immunsystems *in vivo* auch die Präsenz und die

Migration der Leukozyten eine wichtige Rolle spielen, stellt sich die Frage, ob eine zentrale 5-HT-Stimulation einen Effekt auf das System der zirkulierenden Zellfraktion und Migration zeigt.

Da wir in der Studie mit einem Anstieg des PRL i.S. rechnen, liegt ein vermittelnder Einfluss dieses Peptidhormons an einer Immunregulation nahe. Dieser Einfluss des hypophysären Peptidhormons auf das Aktivitätsniveau des Immunsystems wurde in vielen Versuchsansätzen näher beleuchtet, wie sie in den Kapiteln 2.2.5. und 2.3 zusammengefasst sind. Zumeist beschäftigten sich die Studien mit in vitro Einflüssen auf spezielle Zellen des Immunsystems, oder es wurden an Patienten mit pathologischer Hyperprolaktinämie Untersuchungen vorgenommen. Ein weiteres Problem der im Kap. 2.3.2 dargestellten in vivo Studien ist, dass bei hormonalen Veränderungen – sei es aus pathologischen Ursachen, sei es medikamentös, psychisch oder stressbedingt – fast immer eine gleichzeitige Änderung mehrerer endokriner Parameter vorliegt.

Viele dieser Studien versuchten auch, eine Aktivierung einzelner Zellen durch PRL über den PRL-Rezeptor aufzuzeigen.

In der Literatur sind keine Studien zu finden, die all die folgenden Faktoren mitberücksichtigen:

- Untersuchung an gesunden Teilnehmern ohne pathologische Veränderungen
- große Probandenzahl von  $n \geq 40$ ,
- Randomisiertes balanciertes, placebokontrolliertes Cross-over-Design
- Doppelblindsituation
- Berücksichtigung von Stressfaktoren (Wahl der Baseline *nach* Injektion, Versuchsabbruch nach zweimal misslungener Platzierung der Verweilkanüle, und damit Kontrolle des Cortisolspiegels), welche wiederum Auswirkungen auf das endokrine und somit IS haben können

**Frage 3.1.1:** Kommt es unter der zentralen Stimulation des serotonergen Systems durch den 5-HT-Releaser und -Reuptakeinhibitor dex-Fenfluramin zu einer Änderung des Zellmigrationsprozesses bzw. der Verteilung der Leukozyten im Organismus und somit zu einer geänderten absoluten Anzahl an Leukozyten im Blut?

Da es bei einer konstant bleibenden Anzahl einer Obergruppe von Leukozyten innerhalb der Subpopulationen trotzdem zu prozentualen Verschiebungen kommen kann, sollen auch diese innerhalb der Leukozyten betrachtet werden. Diese Darstellung hat auch den Vorteil, unabhängig von Veränderungen des Plasmavolumens durch unterschiedliche Hydratationszustände zu sein.

**Frage 3.1.2:** Kommt es unter der zentralen Stimulation des serotonergen Systems durch den 5-HT-Releaser und -Reuptakeinhibitor dex-Fenfluramin zu einer prozentualen Verschiebung der Leukozyten im Organismus durch Zellmigrationsprozesse bzw. Umverteilungsprozesse ?

Leukozyten stellen eine sehr inhomogene Zellgruppe dar. Daher ist es von Bedeutung, die Zellen und ihre Subpopulationen im einzelnen zu betrachten hinsichtlich der zu erwartenden Wirkung durch die serotonerge Stimulation. Nach den Literaturhinweisen, wie sie in den den Kap. 2.3.2 näher dargestellt wurden, sind die folgenden Veränderungen möglich:

### **3.2 Granulozyten**

Hinweise in der Literatur auf veränderte Zellzahlen der Granulozyten durch Einflüsse zentraler oder hormonelle Stimulation sind nur sehr begrenzt brauchbar, um die Richtung einer möglichen Zellzahlveränderung vorherzusagen.

- In der Gruppe der Neutrophilen wirkt sich ein Cortisolanstieg generell reduzierend auf die neutrophilen Granulozyten aus. Auf der anderen Seite ist gezeigt worden, dass sich PRL hemmend auf die Migration der Zellen auswirkt (s. Kap. 2.3.2.1). Somit ist bei einem ausbleibenden Cortisol-Response aber positivem PRL-Response mit einer Zunahme der Neutrophilen im Blut zu rechnen.

**Frage 3.2.1:** Kommt es unter einer serotonergen Stimulation mit dex-Fenfluramin zu einer Zunahme der Neutrophilen?

- Auch bei den Eosinophilen verdichten sich die Hinweise (s. Kap. 2.3.2.1), dass Cortisol einen reduzierenden Effekt, Geschlechtshormone (Östrogene, Androgen, etc. ) einen stimulierende Effekt auf die Anzahl der Eosinophilen haben.

**Frage 3.2.2:** Kommt es unter einer serotonergen Stimulation mit dex-Fenfluramin zu einer Zunahme der Eosinophilen ?

- Bei den basophilen Zellen finden sich Hinweise (s. Kap. 2.3.2.1), dass sowohl Cortisol und Catecholamine als auch PRL keinen Einfluss auf deren Veränderungsmaß haben. So läßt sich in der Studie auch mit einer unveränderten Zahl rechnen.

**Frage 3.2.3:** Resultieren unter einer serotonergen Stimulation mit dex-Fenfluramin unveränderte Zellzahlen der Basophilen?

### 3.3 Monozyten

Cortisol hat auf die Monozyten einen supprimierenden Effekt. Im Gegensatz dazu konnten viele Untersuchungen die Stimulation der Monozyten/Makrophagen-Fraktion durch PRL aufzeigen, so dass nach erfolgter PRL-Steigerung auch mit einem Anstieg der Monozyten zu rechnen ist (s.Kap. 2.3.2.2).

**Frage 3.3:** Resultiert unter einer serotonergen Stimulation mit dex-Fenfluramin eine Zunahme der Monozyten?

### 3.4 Lymphozyten

Die Literaturhinweise bezüglich endokrin bedingter Veränderungen der B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) deuten teilweise auf uneinheitliches Verhalten hin. Mehrere Studien konnten aber einen stimulierend wirkenden Effekt des PRL zeigen oder auch positive Korrelationen mit der Anzahl der Zellen aufzeigen (s. Kap. 2.3.2.3).

**Frage 3.4.1:** Kommt es unter einer serotonergen Stimulation mit dex-Fenfluramin zu einer Zunahme der B-Zellen ?

Die Datenlage zu den T-Zellen ist ebenfalls uneinheitlich. So konnten einige humane in vivo Studien eine positive Korrelation zwischen dem PRL-Spiegel und der Anzahl der T-Zellen zeigen. Andere konnten dagegen keine Änderung der T-Zellen bei veränderten PRL-Spiegeln feststellen (Kap. 2.3.2.3). Studien, die nach PRL-Anstieg einen Abfall der Zellzahlen zeigten, sind in der Literatur nicht zu finden, so dass wir höchstens mit leicht gesteigerten T-Zellzahlen rechnen können.

**Frage 3.4.2:** Kommt es unter einer serotonergen Stimulation mit dex-Fenfluramin zu einer Zunahme der T-Lymphozyten ?

Da sich die T-Zellgruppe im wesentlichen aus zwei Subpopulationen zusammensetzt, werden diese selbstverständlich auch separat betrachtet.

Untersucht man Studien, die den endokrinen Einfluss auf die Zahl der CD4<sup>+</sup>-und CD8<sup>+</sup>-Zellen analysierten, liegt hier oft eine parallel einhergehende Cortisolserhöhung vor (s. Kap. 2.3.2.3). Darunter konnten wie bei Hennig et al. (1996) sinkende CD4<sup>+</sup>-Zahlen gemessen werden. Studien an Hyperprolaktinämiepatienten, die keine Änderung in der Cortisolkonzentration aufwiesen, konnten keinen direkten Zusammenhang der CD4<sup>+</sup>-und CD8<sup>+</sup>-Level mit dem PRL-Level feststellen. So dürfte auch in unserer Studie kein signifikanter Einfluss zu erwarten sein.

**Frage 3.4.3:** Resultieren unter einer serotonergen Stimulation mit dex-Fenfluramin unveränderte Zellzahlen der CD4<sup>+</sup>-und CD8<sup>+</sup>-Zellen?

#### **4. Der mögliche Zusammenhang zwischen dem PRL-Serumanstieg und den Veränderungen innerhalb der Leukozyten**

Nun interessiert, ob ein serotonerger Stimulus, wie er hier durch dex-Fenfluramin ausgelöst wurde und somit als Indikator der zentralen serotonergen Aktivität gilt, die Immunzellverschiebungen über die vielseitig beschriebenen immunmodulatorischen Eigenschaften von Prolaktin bewirken kann. Dies würde PRL als potentiellen Vermittler zwischen zentral-serotonergen Prozessen und Prozessen auf der Ebene der zellulären Immunparameter klassifizieren. Da dies in dieser Form aber noch nicht untersucht wurde, soll hier ein möglicher Zusammenhang überprüft werden.

**Frage 4.1:** Korrelieren die Veränderungsmaße von PRL unter den Bedingungen „Placebo“ und „d-Fen“ mit den Veränderungsmaßen der *absoluten* Zellzahlen der einzelnen Leukozytensubpopulationen ?

Auch hier muss die prozentuale Verschiebung separat betrachtet werden, da dies, wie oben beschrieben, Vorteile in der Beurteilung der Zellzusammensetzung bietet.

**Frage 4.2:** Korrelieren die Veränderungsmaße von PRL unter den Bedingungen „Placebo“ und „d-Fen“ mit den Veränderungsmaßen der *prozentualen* Verschiebungen der Zellzahlen der einzelnen Leukozytensubpopulationen ?

### **3. Methoden**

#### **3.1 Ort und Zeit der Versuche**

Die Versuche fanden in der Zeit von Juni bis November 1995 in den Räumen 508-510 des Institutsgebäudes der Psychologie Haus F am Philosophikum I, Otto-Behagel-Straße 10, der Justus-Liebig-Universität Gießen statt. Die Blutproben wurden im hämatologischen Labor der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Gießen unter der Aufsicht von Frau Dr.med. Rousseau analysiert.

#### **3.2 Versuchspersonen**

An dem hier beschriebenen Experiment nahmen insgesamt 40 männliche Studenten verschiedener Fachrichtungen im Alter von 20 bis 34 Jahren teil. Das Durchschnittsalter betrug dabei 26,4 Jahre.

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte durch Aushänge sowie Flugblätter, welche an den Mensen und Cafeterien der JLU-Gießen verteilt wurden.

##### **3.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien**

Bei einem Vortermine erhielten die Bewerber eine Beschreibung des Versuchsablaufs und einen Gesundheitsfragebogen (s. Anhang). Anhand der Angaben im Gesundheitsfragebogen erfolgte die Auswahl der geeigneten Probanden. Ausschlusskriterien waren die Kontraindikationen für die Applikation von dex-Fenfluramin (Glaukom, Leber- und Nierenfunktionsstörungen, Herzrhythmusstörungen, psychische Erkrankungen) sowie Allergien, hormonelle Störungen (Diabetes mellitus, Hyper- und Hypothyreose), neurologische Erkrankungen, Migräne, Asthma und Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

Weiterhin wurde darauf geachtet, dass keine akute oder dauerhafte Medikamenteneinnahme vorlag, um u.a. Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln auszuschließen. Der tägliche Zigarettenkonsum sollte nicht mehr als neun Stück betragen. Damit sollte sichergestellt werden, dass bei dem Probanden während der fünfstündigen Versuchsdauer nicht mit einer „Entzugssymptomatik“ gerechnet werden muß. Diese könnte der Proband als Stresssituation erleben und mit Änderung der endokrinen Parameter einhergehen. Unsere Stichprobe umfaßte 27 Nichtraucher und 13 schwache Raucher. Desweiteren wurde auch der durchschnittliche Alkoholkonsum der

Probanden abgefragt. Der dafür verwendete Gesundheitsfragebogen des Institutes für differentielle Psychologie ist im Anhang enthalten.

Da in den psychologischen Fragebögen, die während des Versuchsablaufes vorgelegt wurden u.a. auch ein Intelligenztest sowie Reaktionszeitaufgaben zu lösen waren (nicht in dieser Arbeit berücksichtigt), sollten die Probanden ein in etwa gleiches Niveau in der Schulausbildung aufweisen, weswegen wir das Abitur bzw. einen gleichwertigen Schulabschluss voraussetzten.

Um einigermaßen vergleichbare Daten in Bezug auf das endokrine System und dessen Auswirkungen auf das Immunsystem zu erhalten, beschränkten wir uns auf männliche Probanden der Altersgruppe 20-35 Jahre, da gezeigt wurde, dass die Geschlechtshormone Östrogen und Progesteron, die bei Frauen während des Zyklus in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen, einen Einfluss auf die Synthese, die Aufnahme, den Metabolismus, die Umsatzrate und die Rezeptorbindungsstellen von Serotonin haben (s. Kapitel 2.2.2).

### **3.2.2 Ablauf der Probandenrekrutierung**

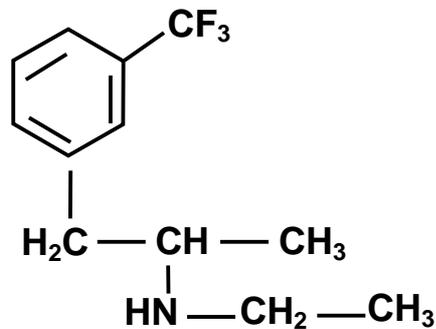
Den Probanden wurde eine Einverständniserklärung mit Informationen über die Risiken an der Teilnahme der Untersuchung (insbesondere die unerwünschten Nebenwirkungen des verabreichten Pharmakons) und über Verhaltensregeln für die Versuchstage mit nach Hause gegeben (s. Anhang). Per Telefon wurde eine Absage erteilt bzw. ein Termine für die beiden Versuchstage verbindlich vereinbart. Selbstverständlich stand es den Probanden frei das Experiment jederzeit und ohne Angabe von Gründen abzubrechen.

Die Aufwandsentschädigung für die Durchführung des gesamten Versuchs, also des Vorterminals und der Anwesenheit und Mitarbeit an beiden Versuchstagen, betrug 140 DM. Das Geld wurde den Probanden am Ende des zweiten Tages in bar ausgezahlt.

### **3.3 Das verabreichte Pharmakon dex-Fenfluramin**

Ziel des hier beschriebenen Experiment war es, das serotonerge System im ZNS zu stimulieren und damit auch die PRL-Freisetzung zu erhöhen. Dies wurde mit einer klinisch gut verträglichen Einzeldosis von 15 mg dex-Fenfluraminhydrochlorid (entsprechend 13 mg dex-Fenfluramin) erreicht, welches unter dem Handelsnamen „Isomeride®“ (Itherapia GmbH - München) erhältlich ist. Klinische Anwendung fand das verschreibungspflichtige Medikament bei der unterstützenden Behandlung der ernährungsbedingter Adipositas; es ist jedoch seit 1997 nicht mehr im Handel (s. dazu auch S.83 ff.).

Bei dex-Fenfluramin handelt es sich um das rechtsdrehende (d-) Stereoisomer von Fenfluramin (d-l-Fenfluramin), das zur Stoffgruppe der serotonergen Phenylethylaminderivate gehört (s. Abbildung 14). Seiner Struktur nach ist es ein Derivat von Methamphetamin.



**Abbildung 14:** Chemische Strukturformel von Fenfluramin = 1-(3'-Trifluormethylphenyl)-2-ethylamino-propan

Da das d-Isomer spezifischer auf die 5-HT-Rezeptoren wirkt und das l-Isomer nur sehr schwach rezeptorspezifisch wirkt, kann man davon ausgehen, dass die halbe Dosis dex-Fenfluramin einer vollen Dosis d-l-Fenfluramin in der Wirkung auf 5-HT-Rezeptoren entspricht. Dex-Fenfluramin besitzt einen serotonergen Wirkmechanismus, der seine pharmakodynamische Wirkung erklärt. Es wirkt als Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (reuptake-inhibitor) und als Serotonin-Freisetzer (releaser) an den präsynaptischen 5-HT-Rezeptoren des ZNS. Dadurch wird die Konzentration an freiem 5-HT im synaptischen Spalt erhöht und so eine verstärkte postsynaptische Signalinduktion erreicht. Im Gegensatz zu racemischem Fenfluramin besitzt dex-Fenfluramin rein serotonin-agonistische Eigenschaften und hat sympathomimetische Aktivität (McTavisk, 1992).

Zur Pharmakokinetik lässt sich sagen, dass die oral applizierte Dosis praktisch vollständig im Darm resorbiert wird, und die maximale Plasmakonzentration nach 4 Stunden erreicht ist. Der aktive Metabolit d-Norfenfluramin ist bereits 1-2 Stunden nach oraler Aufnahme im Plasma nachweisbar (McTavisk, 1992). Dex-Fenfluramin und dex-Norfenfluramin passieren die Blut-Hirn-Schranke sehr schnell, was für eine freie Passage spricht (McTavisk & Heel, 1992). Die Elimination erfolgt hauptsächlich renal, wobei mehr als 90% der verabreichten Dosis in 3-4 Tagen mit dem Urin ausgeschieden werden. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt etwa 18 Stunden. Die absolute Bioverfügbarkeit liegt bei ca. 83%, die restlichen 17% gehen beim First-pass-Effekt durch die Leber verloren (Gebrauchsinformation ISOMERIDE<sup>®</sup>, 1994).

An häufigen Nebenwirkungen treten auf: Mundtrockenheit, Übelkeit, Obstipation und Diarrhö. Als gelegentlich bzw. seltene Nebenwirkungen sind zu nennen: Müdigkeit, Beeinträchtigung des Konzentrationsvermögens, Schwächegefühl, häufige Miktion, Schwindel, Kopfschmerzen, Stimmungsschwankungen, Schlaflosigkeit, Nervosität und depressive Verstimmung. Kontraindiziert ist die Gabe von dex-Fenfluramin bei Glaukom, pulmonaler Hypertonie, Mammatumoren, Leber- und Nierenfunktionsstörungen, Anorexia nervosa, Depression und anderen psychischen Erkrankungen in der Anamnese (Gebrauchsinformation ISOMERIDE<sup>®</sup>, 1994).

Bei einer dreimaligen Dosierung von 20 mg d-l-Fenfluramin im Abstand von 8 Stunden, traten, wie in einer Arbeit von Schürmeyer et al. (1996) berichtet, keinerlei Nebenwirkungen auf. Die dreifache Dosis von d-l-Fenfluramin führte aber bei den Probanden zu Nebenwirkungen wie Mundtrockenheit und leichten Kopfschmerzen. Man kann also davon ausgehen, dass eine Dosis von 60 mg d-l-Fenfluramin (entsprechend 30 mg dex-Fenfluramin) bereits Nebenwirkungen hervorrufen kann und diese wiederum als Stressoren wirken und damit eine Cortisolausschüttung bei den Probanden hervorrufen können. Demgegenüber wurde keine signifikante Cortisol-erhöhung bei einer entsprechenden Einzeldosis von 10 mg dex-Fenfluramin gefunden (Schürmeyer, Brademann, Von zur Mühlen, 1996). In einer Studie von Bond, Feizollah & Lader (1995) wurde eine Dosis von 15 mg versus 30 mg dex-Fenfluramin getestet. Beide Dosen führten zu einer signifikanten Erhöhung der Prolaktinkonzentration im Serum, jedoch traten nur bei der 30 mg Dosierung Nebenwirkungen wie Mundtrockenheit, Konzentrationsschwäche, verschwommenes Sehen und Schweißausbrüche auf, neben einem signifikanten Anstieg der Cortisolkonzentration.

Unser Ziel war es, eine möglichst geringe Dosierung von dex-Fenfluramin einzusetzen, die noch ein Ansprechen zeigt, unter der es aber zur Vermeidung von Nebeneffekten auf das endokrine System zu möglichst wenig Nebenwirkungen kommen sollte. Dies entspricht genau einem der fünf Kriterien die nach Yatham & Steiner (1993) im Rahmen von neuroendokrinen Tests gefordert werden. Wir entschieden uns deshalb zu der eher niedrigen Einzeldosis von 15 mg dex-Fenfluramin per os.

Die normalerweise klinisch verabreichte Dosis beträgt zu Beginn einer Adipositas-therapie 15 mg dex-Fenfluramin täglich (entsprechend eine Kapsel) und wird ab dem dritten Tag auf eine Dosis von 30 mg (entsprechend zwei Kapseln) pro Tag gesteigert (Gebrauchsinformation ISOMERIDE<sup>®</sup>, 1994).

Der Vollständigkeit halber sollte erwähnt werden, dass der Appetitzügler dex-Fenfluramin (Isomeride<sup>®</sup>) sowie zwei weitere Produkte dieser Substanzklasse im September 1997 von ihren Herstellern vom Markt genommen wurden (Schattenfroh, 1997). Grund dafür waren vorausgegangene Berichte im *New England Journal of Medicine* (Nr. 337, 1997) über den Tod einer Patientin aus den USA an pulmonaler Hypertonie, die über 23 Tage eine Kombination von zwei Appetitzüglern (Fenfluramin und Phenteramin) eingenommen hatte (Mark, Patalas & Chang, 1997). Abgesehen von

dieser bereits bekannten Nebenwirkung der pulmonalen Hypertonie bei Langzeitgabe wird im gleichen Heft über eine bis dahin unbeschriebene Nebenwirkung berichtet. Bei 24 Frauen, die dieselbe Kombination an Appetithemmern über einen Zeitraum von ein bis 12 Monaten einnahmen (Fenfluramin und Phenteramin) entwickelte sich eine schwere Fibrosierung der Herzklappen des rechten und linken Herzens. Dies führte zu einer Klappeninsuffizienz, die in fünf Fällen sogar herzchirurgisch behandelt werden musste (Connolly, Crary & McGoon, 1997). Nicht nur die Kombinationstherapie, die in Deutschland ohnehin nicht zulässig war, führte zu diesen Klappenveränderungen, es wurden auch derartige Fälle bei Monotherapien beispielsweise unter dex-Fenfluramin beschrieben (Graham & Green, 1997).

Eine zu diesem Zeitpunkt laufende placebokontrollierte Studie mit einer Retardform von dex-Fenfluramin wurde daraufhin abgebrochen und bei allen 1072 Teilnehmern eine Echokardiographie durchgeführt. Dabei ergaben sich nach einer durchschnittlichen Einnahmedauer von 77 Tagen jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf Morphologie und Motilität der Aorten- und Mitralklappen im Verum-Placebo-Vergleich (Blae, 1998). Ob und wann Pharmaka dieser Substanzklasse wieder auf dem Arzneimittelmarkt zugelassen werden, bleibt abzuwarten.

### **3.4 Versuchsdesign**

Wie bereits in Kapitel 2.2.2.3 näher beschrieben, zeigt der zirkadiane Prolaktinspiegel eine deutliche intraindividuelle Schwankung. Ebenso ist auch die physiologische PRL-Konzentration interindividuell sehr variabel. Zur Prüfung der Ansprechbarkeit des Organismus auf eine serotonerge Stimulation mit einem Anstieg von PRL, entschieden wir uns daher für eine balancierte, placebokontrollierte Cross-over-Doppelblindstudie mit Messwiederholungsdesign. Somit erhielt jeder Proband an seinen beiden Versuchstagen einmal die Verum- und einmal die Placeboapplikation. Die Bedeutung und Notwendigkeit einer Placebokontrolle im Studiendesign wird von Meltzer (1993), gerade bei neuroendokrinen Studien, sehr betont.

Neben zirkadianen Schwankungen des Prolaktins gibt es Schwankungen in der Anzahl und prozentualen Verteilung der Immunzellen im Blut, deren Ausmaß nicht zu unterschätzen ist. Neben dem biologischen Zirkadianrhythmus existiert auch ein „Zirkaseptanrhythmus“ mit einer Dauer von ca. sieben Tagen (Knapp, 1992). Deshalb fordert Knapp, dass diese biologischen Rhythmen mit Auswirkungen auf das IS sowohl in der Planung als auch in der Auswertung von Studien mit berücksichtigt werden. Wir entschieden uns deshalb dafür, den Versuchsbeginn immer auf 14:00 Uhr zu legen und die beiden Versuchstage genau im Abstand einer Woche einzuhalten.

Die Zuteilung eines Probanden zu einem Raum und einem Versuchsleiter wurde für die Reihenfolgen Placebo → Verum und Verum → Placebo ausbalanciert und an den beiden Versuchstagen für jede Person konstant gehalten. Die Zuordnung zu den Versuchsräumen sowie die Gabe und Reihenfolge der Verum- bzw. Placeboapplikation auf die zwei Versuchstage erfolgte ausbalanciert und ist in Tabelle 10 dargestellt.

Daneben wurden auch die biologischen Parameter (PRL-Serumkonzentration und periphere Leukozyten im Blut) in Unkenntnis darüber bestimmt, ob es sich um die Probe eines Verum- oder eines Placeboprobanden handelte.

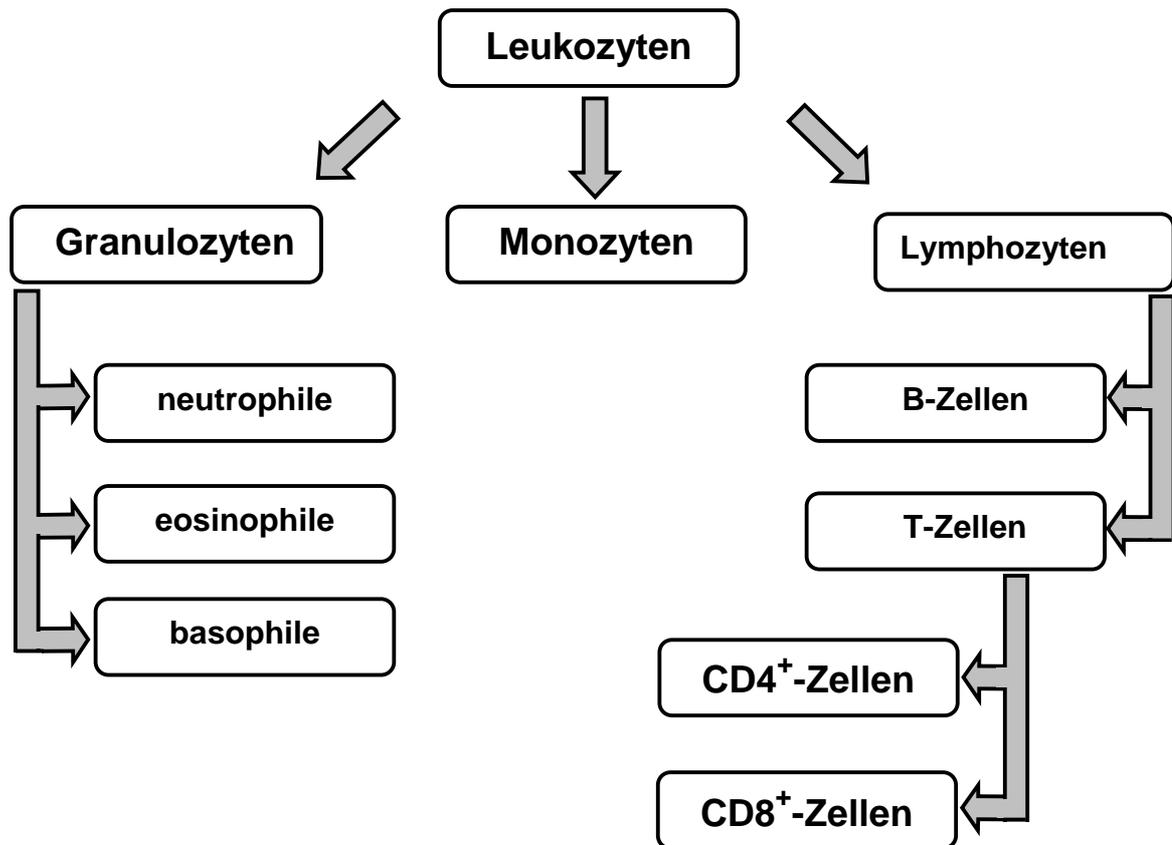
**Tabelle 10:** Versuchsplan für beide Untersuchungstage mit Angabe der Anzahl der jeweiligen Probanden (n).  
(V = Verumgabe, P = Placebogabe)

Raum	1. Versuchstag	2. Versuchstag	n Probanden
508	V	P	10
	P	V	10
510	V	P	10
	P	V	10
n	40	40	40
∑ Versuche	80		

### 3.5 Messverfahren

#### 3.5.1 Erhebung der zellulären immunologischer Parameter

Zur Bestimmung der zellulären Immunparameter wurde bei den insgesamt fünf Messzeitpunkten je ein EDTA-Röhrchen mit 7ml Vollblut entnommen. Die erste Blutentnahme erfolgte direkt nach dem Legen der Braunüle (=B0), dann nach 60 min (B1), 150 min (B2), 210 min (B3) und 255 min (B4). Bis zur Analyse wurde das Blut im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt und in einer Kühltasche zum hämatologischen Labor der Medizinischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen gebracht. Dort wurden folgende Zellpopulationen ermittelt (Abbildung 15):



**Abbildung 15:** Quantitativ ermittelte Zellpopulationen aus den Blutproben mittels Durchflusszytometrie

Die Analyse der im Vollblut enthaltenen Immunzellen erfolgte in diesem Institut auf photo-optische Weise mit einem Fluoreszenz-Activated-Cellsorter (FACScan) bzw. Durchflusszytometer der Firma *Becton Dickinson*.

Beim Durchflusszytometer werden zur Vorbereitung Alliquots zu je 100µl heparinisierten Vollblutes mit verschiedenen monoklonalen Anti-CD-Antikörpern (im Kit der Firma Becton-Dickinson) für 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Erythrozyten werden dann in einer speziellen Lösung (*Becton-Dickinson*) lysiert, dann wird alles zentrifugiert und anschliessende gewaschen.

Die wieder in Pufferlösung gebrachten Zellen werden durch eine Fließkammer in Einzelzellsuspension gebracht und in Form von Tröpfchen an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Die Streuung dieses Laserlichts wird von Photomultipliern gemessen, wobei die sog. Vorwärts-Lichtstreuung mit der Größe der Zellen korreliert und die sog. seitliche Lichtstreuung mit dem Kern/Plasma-Verhältnis bzw. der Granularität. So lassen sich primär die drei Hauptkomponenten der Leukozyten – Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten – voneinander trennen. Zur genaueren Auftrennung

werden Antikörper, die mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt sind, eingesetzt. Diese werden durch das Laserlicht angeregt und emittieren je nach eingesetztem Farbstoff ihre Energie in Form von Licht einer ganz bestimmten Wellenlänge, das von den Photomultipliern erfasst wird. Weiterhin können bei diesem Gerät die feinen zellenthaltenden Tröpfchen unter Computerkontrolle elektrisch unterschiedlich geladen werden und dann durch Ablenkplatten weiter aufgetrennt werden. So ist eine ca. 99%ige Reinheit der Zellen zu erreichen (Burmester & Pezzutto, 1998).

Im Ergebnis werden die ermittelten Werte in einem mehrdimensionalen Koordinatensystem (Nukleogramm) dargestellt, und es ist möglich, Neutrophile, Basophile, Eosinophile, Monozyten und Lymphozyten sowie Vorläuferstufen zu unterscheiden. Der Einsatz spezifischer fluoreszierender monoklonaler Antikörper ermöglicht eine Immunphänotypisierung im Durchflusszytometer, mit der die Lymphozyten B-Zellen (CD19), T-Zellen (CD3), T-Helferzellen (CD4) und T-Suppressorzellen (CD8) identifiziert werden (Wacker, 1999).

### **3.5.2 Bestimmung des endokrinen Parameters Prolaktin**

An den fünf Messzeitpunkten wurde weiterhin je eine Fibrinogen-Monovette der Firma *Sarstedt* mit ca. 7ml Blut gefüllt, diese nach 15 min in einer *Beckmann*-Kühlzentrifuge 15 min bei 4200 Upm (entsprechend der 2500 fachen Erdbeschleunigung) zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum zu je 0,8 ml in vier auf Brucheis stehende *Eppendorf*-Cups pipettiert und sofort bei  $-30^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Am Ende eines Versuchstages wurden die gesammelten *Eppendorf*-Cups dann bis zur Auswertung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die quantitative Analyse des Serum-Prolaktinspiegels erfolgte mit Hilfe des Radioimmunassays "ImmuChem<sup>TM</sup>- Coated Tube Prolactin  $^{125}\text{I}$  IRMA Kit" der Firma *ICN Biomedicals*. Dabei werden 25  $\mu\text{l}$  der zu bestimmenden Probe in ein Behältnis gegeben, an dessen Innenseite ein PRL-Antikörper mit seinem  $\text{F}_\text{C}$ -Fragment fest gebunden ist. Das in der Probe enthaltene PRL wird von den AK gebunden, und weiterhin werden 200  $\mu\text{l}$  eines mit  $^{125}\text{I}$  gekoppelten AKs gegen PRL dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  wird überschüssiges  $^{125}\text{I}$ -Antiprolaktin durch Spülen mit einer Waschlösung (2 x 1 ml) beseitigt. In einem  $\gamma$ -Zähler wird daraufhin die verbleibende Aktivität von  $^{125}\text{I}$  bestimmt, die ein indirektes Maß für die in der Probe enthaltene Prolaktinkonzentration darstellt. Das Kit erlaubt anhand einer Eichfunktion die Bestimmung von PRL-Konzentrationen im Bereich von 0 – 100 ng/ml Serum. Höhere Werte werden nach entsprechender Vorverdünnung bestimmt. Für alle Proben wurden zwei Werte bestimmt, und der daraus errechnete Mittelwert zur weiteren Auswertung eingesetzt. Die Ermittlung der PRL-Konzentration erfolgte in Unkenntnis darüber ob es sich um eine Verum- oder Placeboprobe handelte.

### **3.5.3 Cortisolbestimmung aus dem Speichel**

Um einen möglichen störenden Einfluss durch eine gesteigerte Freisetzung des Stresshormons Cortisol auf die Immunzellen zu überprüfen, bestimmten wir im Versuchsablauf mehrfach dessen Konzentration.

Die Cortisolkonzentration wurde in dieser Studie aus dem Speichel mit Hilfe von sog. „Sarstedt-Salivetten<sup>®</sup>“ bestimmt. Dabei wird der Proband aufgefordert, für 4 Minuten ein kleines Watteröllchen in den Mund zu geben, ohne dieses jedoch mit den Fingern zu berühren und zu schlucken. Nach dem Einspeicheln wird das Watteröllchen in einen passenden Kunststoffbehälter zurückgegeben in dem sich ein siebartiger Einsatz befindetet. Auch hier wurde darauf geachtet, dass es zu keiner Kontamination durch die Finger kam. Daraufhin wird die Salivette verschlossen und für fünf Minuten bei 4500 U/min zentrifugiert. Der klare Speichel sammelt sich am Boden der Salivette und wurde bis zur endgültigen Cortisolmessung bei  $-30^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt während der Siebeinsatz und das Watteröllchen verworfen wurden.

Die Cortisolbestimmung erfolgte, wie die PRL-Bestimmung, mit einem  $^{125}\text{I}$ -Radioimmuno-Assay (RIA), welcher sich nach Kirschbaum, Strasburger, Jammers & Hellhammer (1989) als reliabel und valide erwiesen hat. Wir verwendeten dabei das „Magic Cortisol“-RIA-Kit der Firma *Ciba-Corning*. Die Auswertung erfolgte in Unkenntnis hinsichtlich der Bedingung Verum/Placebo. Zur genaueren Bestimmung wurden Doppelmessungen durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

Diese Methode stellt ein gutes, nicht-invasives und somit stressfreies Verfahren zur Messung der biologisch aktiven Cortisolfraktion dar (Wade, 1992).

### **3.5.4 Weitere Messwerte**

Einige weitere im Versuchsablauf (s. Abb. 16) erhobene Messwerte und Parameter wurden in der weiteren Auswertung dieser Arbeit nicht berücksichtigt, sollen aber der Vollständigkeit halber hier erwähnt werden.. Dazu gehören die sublingualen Temperaturmesswerte an den fünf Messpunkten T0-T4, die Reaktionszeitaufgaben einmal vor, einmal nach Wirkungseintritt des Medikaments sowie Befindlichkeits- und habituelle Fragebögen. Die Ergebnisse, dieser in anderen Arbeiten ausgewerteten Faktoren, sind dort nachzulesen.

### **3.6 Beschreibung des Versuchsablauf**

Um einen reibungslosen und fehlerfreien Versuchsablauf zu erreichen, der genau in der vorgegebenen Zeit lag, wurden mehrere Vorversuche gemacht, in denen die Versuchsleiterinnen und Versuchsleiter das Procedere üben konnten.

Das Versuchsleiterteam bestand aus vier Psychologiestudentinnen die für die Fragebogenerhebungen, die Speichelprobengewinnung, die Durchführung der apparativen Verfahren und die sublinguale Temperaturmessung zuständig waren, sowie zwei Doktoranden der Medizin. Diese übernahmen das Legen der Verweilkanüle, die Blutentnahmen sowie die Aufbereitung der Blut- und Speichelproben.

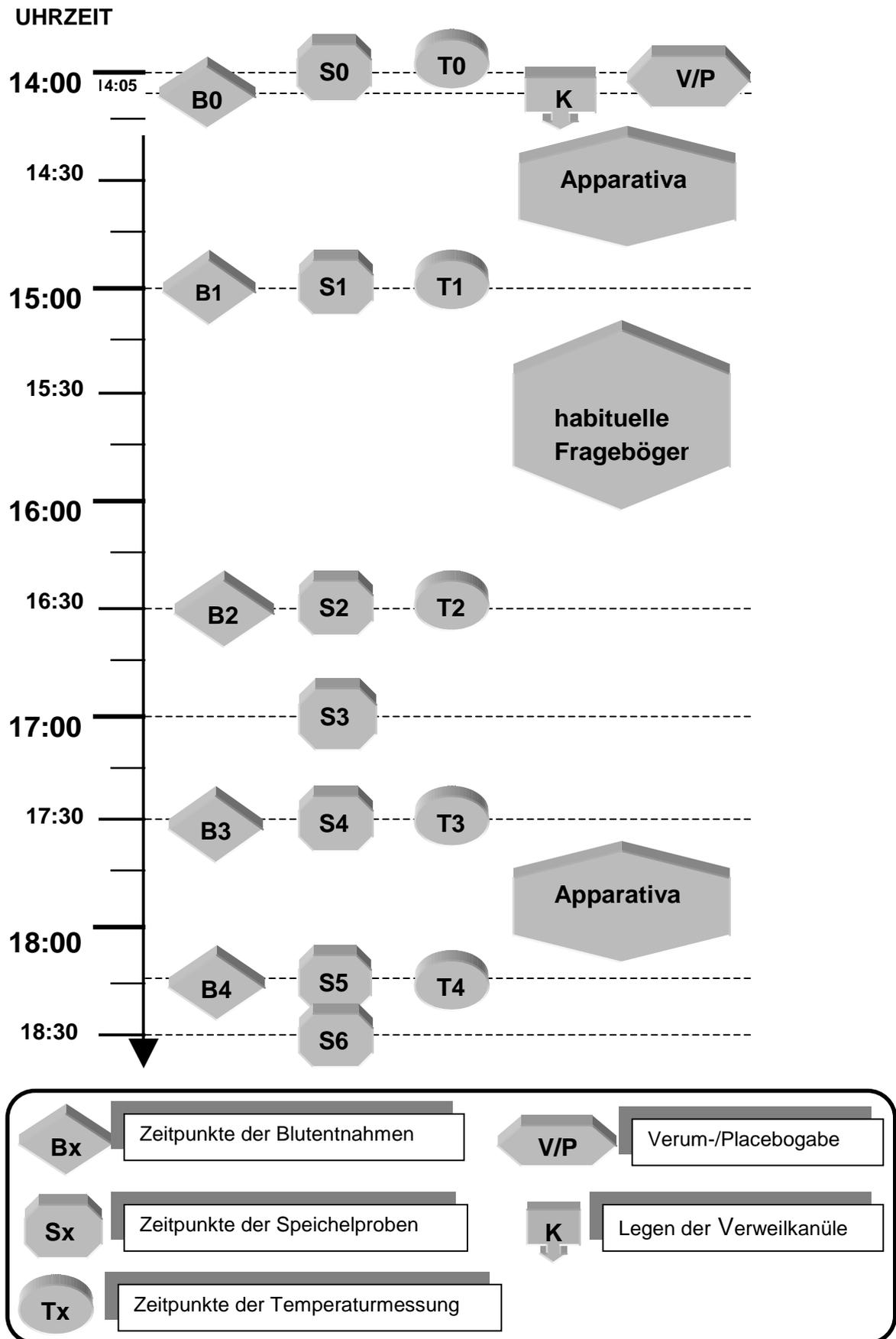
Die im Vortermine als geeignet ausgewählten Probanden wurden zwei Tage vor dem Versuchsbeginn telefonisch an den Termin und die Einhaltung der Bedingungen erinnert. Diese bestanden in einer tryptophanarmen Kost am Vortag, d.h. den Verzicht auf Bananen, Nüsse, Schokolade und anderer kakaohaltiger Speisen und Getränke sowie in einer Alkoholkarenz am Vorabend, da gezeigt werden konnte, dass Alkohol die Neurotransmitterkonzentrationen im ZNS verändern kann. (De Witte,1996).

Die Probanden wurden ebenfalls dazu aufgefordert spätestens um 24 Uhr schlafen zu gehen. Dies ist notwendig, da sowohl Tryptophan als auch der Schlaf-Wach-Rhythmus Einfluss auf die endokrinen Parameter Serotonin und Prolaktin haben. Am Versuchstag selbst durften zusätzlich keine koffeinhaltigen Getränke wie Kaffee, Cola oder Schwarztee konsumiert werden um deren stimulierende Potenz auszuschließen.

An den Versuchsnachmittagen wurde ein, bzw. falls möglich auch zwei, Probanden gebeten, sich um 13:30 Uhr in den Versuchsräumen einzufinden. Davor sollte bis spätestens 13:00 Uhr ein Mittagessen eingenommen worden sein. Der Versuchsbeginn war stets zwischen 13:45 Uhr und 14:00 Uhr angesetzt, um den zirkadianen Einfluss auf das endokrine und immunologische System berücksichtigen zu können.

Falls zwei Versuchspersonen an einem Nachmittag einbestellt waren, wurde 15 Minuten zeitversetzt begonnen, um einen reibungslosen Ablauf des Versuchsaufbaus zu gewährleisten.

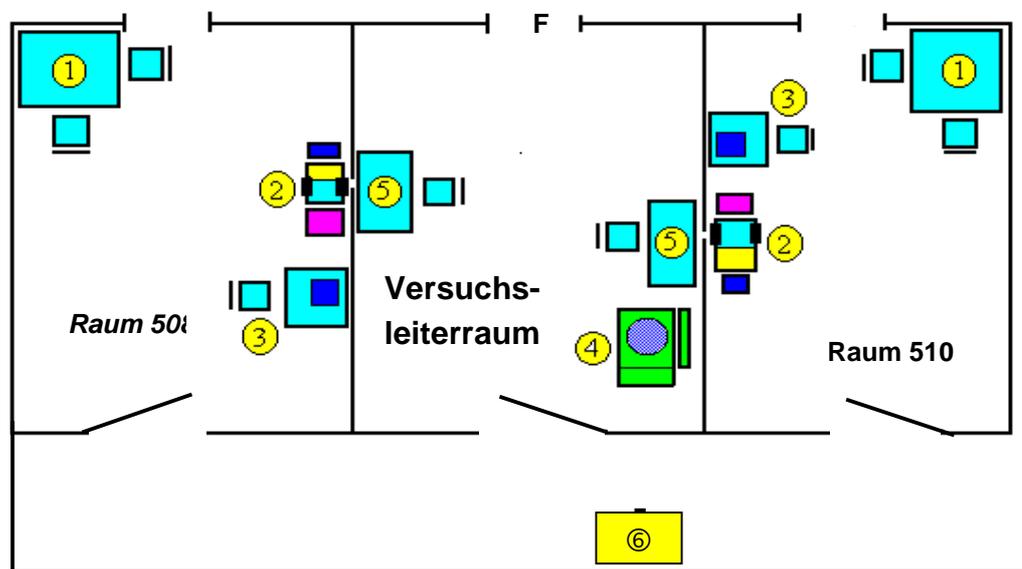
Der Ablauf der Studie ist schematisch in Abbildung 16 auf der folgenden Seite dargestellt:



**Abbildung 16:** Darstellung des Versuchsablaufs der Tage 1 und 2 mit Angabe der Zeitpunkte für Blutentnahmen, Speichelproben, Temperaturmessung,

apparative Messverfahren und Ausfüllen der vorgelegten Fragebögen.

Abbildung 17 zeigt die Untersuchungsräume, die so angeordnet wurden, dass es möglich war, bei zwei Probanden gleichzeitig von einem Raum aus die Blutentnahmen vorzunehmen.



- ① = Versuchsleitertisch
- ② = Probandenstuhl (verstellbar), Blickrichtung zum Monitor
- ③ = Tisch mit Monitor für Probanden und Versuchsleiterstuhl
- ④ = Zentrifuge
- ⑤ = Arbeitstisch der Versuchsleiter für Blutentnahmen
- ⑥ = Gefriereinheit (-80 °C)
- F = Fenster

**Abbildung 17:** Schematische Darstellung der Versuchsräumlichkeiten mit den beiden Probandenräumen, sodass paralleles Arbeiten an zwei Probanden möglich war.

Der Proband wurde kurz vor Beginn der Untersuchung von der Versuchsleiterin gebeten, die Toilette aufzusuchen, um dies während des Versuchsablaufes zu vermeiden. Dann wurde ihm die korrekte Handhabung der Salivetten erklärt, die der Speichelprobengewinnung dienen. Ein kleines Watteröllchen musste dazu, ohne mit

den Fingern berührt zu werden, aus der Salivette in den Mund gebracht werden, wo es genau 4 min eingespeichelt wurde, und anschließend auch wieder ohne Zuhilfenahme der Finger in die Salivette zurückbefördert werden. Die Zeitpunkte der sieben Speichelproben (S0-S6) sind der Abbildung 16 zu entnehmen.

Fünf Minuten nach der ersten Speichelprobe, also um 14:05, wurde dem Probanden vom Medizindoktoranden eine Verweilkanüle in eine Vene des linken Unterarms bzw. des rechten Unterarms bei Linkshändern, gelegt. Um einen extremen Anstieg von Cortisol und Prolaktin durch den Punktionsstress zu vermeiden, wurden maximal zwei Versuche unternommen, die Vene zu punktieren, andernfalls der Proband nach Hause geschickt und zu einem anderen Zeitpunkt wieder einbestellt.

Die Versuchsperson nahm anschließend auf einem bequemen Untersuchungsstuhl mit verstellbarer Rückenlehne und verstellbarem Fußteil Platz. Dies ermöglichte den Versuchsleitern einem Schwindelanfall oder einer Übelkeit des Probanden aufgrund der Venenpunktion in adäquater Weise durch entsprechende Lagerung zu begegnen. Jedoch traten bei keinem der 40 Studienteilnehmer ernsthaftere Beschwerden auf, sodass kein Versuch abgebrochen werden musste. Eine Bedingung der Blutentnahmen während des Versuchsablaufs war, dass der Vorgang in einer vom Probanden unbemerkten Weise geschieht. Über ein kleines Loch in der Wand auf Höhe der Armlehne wurde so ein Infusionsbesteck aus undurchsichtigem schwarzem Material an die Kanüle angeschlossen. Vom Nebenzimmer aus konnte dann somit dem Probanden unbemerkt Blut über ein Drei-Wege-Hahn-System entnommen werden. Damit sollte sichergestellt werden, dass eine Blutentnahme nicht zu psychischen oder physiologischen Reaktionen führte, die die untersuchten Parameter beeinflussen könnten. In der Zeit, in der kein Blut entnommen wurde, wurde physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) infundiert. Die infundierte Menge betrug 200-250 ml und diente dem Volumenausgleich der entnommenen Blutmenge von ca.160 ml pro Versuchstermin und sorgte gleichzeitig dafür, dass das Lumen der Kanüle freigehalten wurde.

Bei der Blutentnahme über das Schlauchsystem wurde zuerst ein ausreichendes Volumen mit einer Spritze aspiriert, welches verworfen wurde, und anschließend wurden die Serum- und EDTA-Röhrchen gefüllt. Die erste Blutprobe (B0) wurde direkt nach dem Legen der Kanüle entnommen. Alle weiteren Entnahmezeitpunkte sind in der Abbildung 16 dargestellt. Für den Fall, dass zur Blutentnahme eine Stauung der Venen des Oberarms nötig werden sollte, wurde dem Probanden zu Beginn eine Blutdruckmanschette um den Oberarm angelegt. Diese konnte bei Bedarf auf einen Druck von 60-80 mmHg vom Versuchsleiterraum aus aufgeblasen werden. Dem Probanden wurde gesagt, dass die Manschette in unregelmäßigen Abständen immer wieder einmal aufgeblasen würde und für ihn keine Bedeutung habe. Damit sollte ein für den Probanden erkennbarer Zusammenhang zwischen Blutentnahme und Aufblasen der Manschette vermieden werden.

Zur Temperaturmessung wurde ein digitales Fieberthermometer verwendet, das aus hygienischen Gründen mit einer entsprechenden Schutzhülle versehen wurde. Die Messung erfolgte sublingual zu den gleichen Zeitpunkten (T0-T4) wie die Blutentnahme und wurde von den Versuchsleiterinnen durchgeführt.

Mit der ersten Temperaturbestimmung und Blutprobe wurde das Medikament bzw. das Placebo in einer Kapsel verabreicht, die mit Mineralwasser geschluckt werden sollte. Die gesamte den Probanden angebotene Trinkmenge wurde auf 400 ml Mineralwasser über den gesamten Versuchszeitraum begrenzt.

Zwischen den einzelnen Blut- und Speichelproben musste der Proband mehrere habituelle und aktuelle Persönlichkeits- und Befindlichkeitsfragebögen ausfüllen. Außerdem wurden ihm Reaktionszeitaufgaben auf einem PC und speziell dafür konstruierten Apparaten dargeboten, einmal vor dem Einsetzen der Medikamentenwirkung und ein weiteres Mal nach Einsetzen der Wirkung von dex-Fenfluramin. In dieser Arbeit wird nicht näher auf diese Verfahren eingegangen, Einzelheiten dazu sind in den entsprechenden Diplomarbeiten nachzulesen.

Um 18:15 Uhr erfolgte die letzte Blutentnahme und anschließend die Entfernung der Venenverweilkanüle. Nach einer letzten Speichelprobe und einer subjektiven Einschätzung des Probanden, ob er Verum oder Placebo erhalten habe, war der erste Versuchstag beendet. Die Teilnehmer wurden noch einmal darauf hingewiesen, dass die Fahrtüchtigkeit durch das Medikament eingeschränkt sein kann und ihnen deshalb angeboten wurde, mit dem Taxi nach Hause gebracht zu werden.

Der zweite Versuchstag, der eine Woche später am selben Wochentag zur gleichen Uhrzeit stattfand, unterschied sich nur darin, dass die Probanden, die in der Vorwoche Placebo erhielten, nun Verum verabreicht bekamen und umgekehrt. Außerdem wurde die Reihenfolge der apparativen Verfahren vertauscht und anderen habituellen Fragebögen vorgelegt. Ansonsten verlief dieser Tag genau wie der erste Tag. Am Ende des zweiten Tages erhielten die Probanden ihre Aufwandsentschädigung für die Teilnahme an der Studie von 140,- DM.

Die Applikation von Verum bzw. Placebo erfolgte im Doppelblindversuch. Die Aufteilung auf die beiden Versuchsräume und die Zuteilung der Versuchsleiter/innen wurden randomisiert.

Während des gesamten Versuches wurde an den Probanden zu fünf Zeitpunkten eine Blutentnahme vorgenommen. Die erste Blutprobe wurde direkt am Anschluss an die Punktion der Vene mit der Verweilkanüle um 14:05 Uhr (=B0) entnommen. Eine knappe Stunde nach der Punktion erfolgte die zweite Blutentnahme um 15:00 Uhr (=B1). Die weiteren Blutproben wurden dann um 16:30, 17:30 und 18:15 Uhr entsprechend B2, B3 und B4 abgenommen.

### 3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS® in der Version 9.0.

1. Abhängige Variablen in der Versuchsanordnung waren die PRL-Konzentration im Serum, die Cortisolkonzentration im Speichel und die Zahl der Leukozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Monozyten, Lymphozyten, B-Zellen, T-Zellen, CD4- sowie CD8<sup>+</sup>-Zellen) sowohl auf absoluter Basis als auch als prozentualer Anteil.

Zur Überprüfung des Einflusses von dex-Fenfluramin auf die jeweiligen abhängigen Variablen wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse bzw. Kovarianzanalyse mit Messwiederholung gerechnet. Die beiden Faktoren waren zum einen die Bedingung (dex-Fenfluramin versus Placebo) zum anderen die Zeit (60, 150, 210, 255 Minuten nach Einnahme der Medikation) für PRL und die Immunparameter und für Cortisol (60, 150, 180, 210, 255, 285 Minuten nach Einnahme der Medikation)

Die Baselinemessung ging als Kovariate in die Berechnung ein, wenn sich signifikante Baselineunterschiede mit Hilfe des t-Tests für abhängige Stichproben ergeben würden.

2. Die Frage des Zusammenhangs zwischen Veränderungen der PRL-Konzentration im Serum und den Veränderungen der absoluten und prozentualen Anteile der Leukozytenpopulationen unter den beiden Bedingungen (Verum/Placebo) wurde mit Hilfe der Pearson-Produkt-Moment-Korrelation zwischen den Änderungswerten in den abhängigen Variablen geklärt. Die genaue Definition der Änderungswerte ist im Kap. 4.6 wiedergegeben.

Bei allen durchgeführten Berechnungen wurde das statistische Signifikanzniveau auf  $p \leq 0,05$  (zweiseitige Testung) festgesetzt.

## **4. Darstellung der Ergebnisse**

Die deskriptive Darstellung der Ergebnisse erfolgt in fünf Hauptabschnitten. Zuerst soll kurz dargestellt werden, welche Ausfälle und Probleme sich im Versuchsablauf ergaben. Als nächstes (4.2) die Induktion des PRL-Anstiegs nach dex-Fenfluramin-Stimulation, und (4.3) den Veränderungen der Speichelcortisolkonzentration nach Medikamentenapplikation. Schließlich (4.4) die Veränderungen der Leukozytenpopulationen im zirkulierenden Blutvolumen nach serotonerger Stimulation, wobei zwischen den absoluten Zellzahlen und den prozentualen Anteilen der jeweiligen Gruppe unterschieden wird. Als letzter Punkt (4.5) soll überprüft werden, ob eine Zellzahlveränderung mit einem Anstieg an Serumprolaktin korreliert.

### **4.1 Ergebnisse aus dem Versuchsablauf**

Von den 40 die Einschlusskriterien erfüllenden Probanden, die an zwei Terminen erscheinen mussten, gab es keinen Ausfall. Zweimal mussten Probanden nach Hause geschickt werden, um am nächsten Tag nocheinmal zu erscheinen, da es nicht möglich war, die Verweilkanüle beim zweiten Versuch richtig im Unterarm zu platzieren. Am zweiten Untersuchungstag war dies bei beiden Probanden problemlos im ersten Anlauf möglich und so konnte einer aufkommenden stressreaktiv verbundenen endokrinen Änderung vorgebeugt werden.

Alle Probanden erschienen gesund und pünktlich unter der Versicherung, sich an die Vorgaben bezüglich Nahrungseinschränkung, Koffeinkonsum und sportlicher Betätigung gehalten zu haben, wieder zum zweiten Termin, so dass keine Probanden ausfielen und auch keine zusätzliche Probandenrekrutierungen nötig wurden.

Bei zwei Probanden war es zum Ende der Untersuchung, d.h. zum letzten bzw. vorletzten Blutentnahmezeitpunkt nicht mehr möglich, eine ausreichende Menge an Blut für alle zu bestimmenden Parameter zu aspirieren. Dies lag vermutlich an einer Thrombusbildung in der Verweilkanüle. So konnten einige Werte nur mit einer Fallzahl von  $n=38$  bzw.  $n=39$  gerechnet werden.

Sowohl unter Verum als auch unter Placebo berichteten die Probanden von keinerlei medikamententypischen Nebenwirkungen. Sie wurden am Ende des zweiten Versuchstages um eine subjektive Einschätzung gebeten, an welchem Termin sie Placebo bzw. Verum einnahmen. Es zeigte sich, dass die Angaben im Bereich einer

zufälligen Angabe lagen und keine überzufällige Beziehung zur erfolgten Applikation zeigten.

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse bezogen auf die Fragestellungen im Einzelnen dargestellt.

#### **4.2 Die Zunahme des Serumprolaktinspiegels nach dex-Fenfluramin-Applikation**

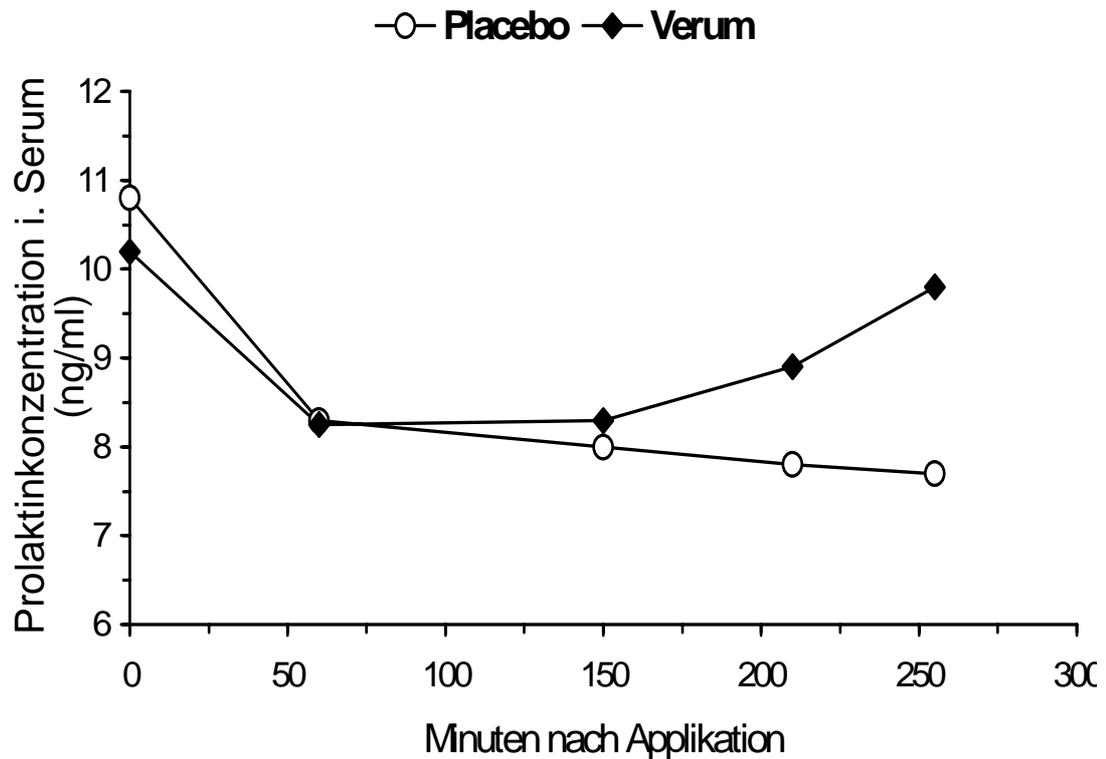
Diese Hypothese sollte überprüfen und bestätigen, ob die Gabe des 5-HT-Releasers und -Reuptakeinhibitors auch in der niedrigen Einmal-Dosierung von 15 mg zu einer Stimulation des serotonergen Systems führt und so ein Anstieg des Serumprolaktins erreicht werden kann. Zur genaueren Überprüfung der Hypothese, dass eine zentrale serotonerge Stimulation mit einem PRL-Anstieg einhergeht, wurden die jeweils zeitgleich bestimmten Baseline-Werte B1 (60 min nach Einnahme der Prüfsubstanz) unter Verum- und Placebobedingungen miteinander verglichen. Siehe hierzu auch folgende Tabelle 11:

**Tabelle 11:** Durchschnittliche PRL-Konzentrationen der Baseline-Werte B1 unter Placebobedingung ([PRL]-P1) und Verumbedingungen ([PRL]-V1) im Vergleich. Konzentrationsangaben in ng/ml.

[PRL]-P1	[PRL]-V1	Differenz	t-Wert	df	p
8,30	8,25	0,05	1,09	39	n.s.

Statistisch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede dieser Werte. So konnte bei den weiteren Berechnungen auf eine Baselinekorrektur verzichtet werden.

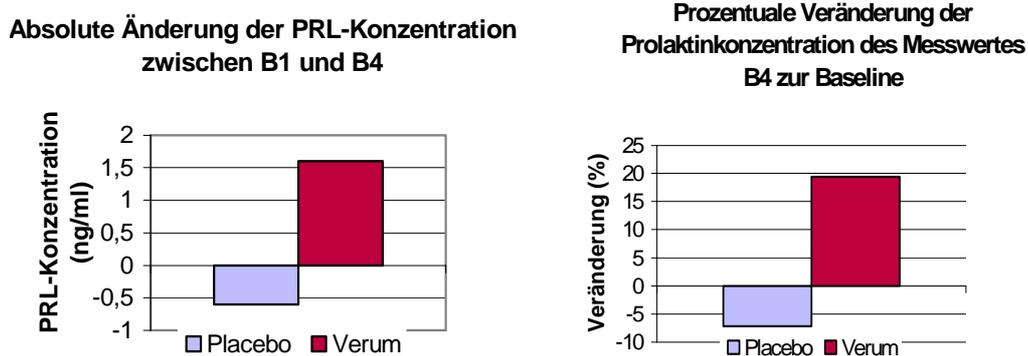
Nun wurde überprüft, welchen Effekt das Medikament in der Gesamtstichprobe auf die PRL-Konzentration ausübt. Die graphische Darstellung des Prolaktinkonzentrationsverlaufs unter Verum und Placebo zu den fünf Messzeitpunkten wird in Abb. 18 wiedergegeben:



**Abbildung 18:** Verlauf der Mittelwerte der Prolaktinkonzentration unter den Bedingungen Verum (= dex-Fenfluramin) und Placebo zu den verschiedenen Messzeitpunkten bezogen auf die Gesamtstichprobe.

Wie aus der Abbildung 18 deutlich hervorgeht, zeigten sowohl die PRL-Konzentration unter Placebo als auch die unter d-Fen ihr Maximum gleich zu Beginn der Untersuchung. Eine Stunde nach Applikation von Verum bzw. Placebo sind beide Konzentrationen auf ein annähernd identisches Niveau, den Baselinewert B1, abgefallen. Im weiteren Verlauf ist unter Placebo ein weiterer Rückgang der PRL-Konzentration zu sehen, wie er aufgrund des zirkadianen Rhythmus zu erwarten war. Unter dex-Fenfluramin ist dagegen in den Messwerten nach dem Baseline-Wert ein Anstieg der Prolaktinmittelwerte deutlich zu erkennen.

Vergleicht man die Baselinewerte mit denen der letzten Messung B4, sind die folgenden Veränderungen in absoluten bzw. prozentualen Werten zu sehen (Abb. 19):



**Abbildung 19:** Die Veränderung der PRL-Werte vom Baselinewert B1 zum letzten Messzeitpunkt B4 (255 min nach Einnahme). Angegeben sind die absoluten Veränderungen in ng/ml (links) und die prozentualen Veränderungen (rechts).

Wie der o.g. Abbildung zu entnehmen ist, resultiert in der d-Fengruppe ein knapp 20-prozentiger *Anstieg*, in der Placebogruppe ein 7-prozentiger *Abfall* der PRL-Serumkonzentration.

Im Rahmen der statistischen Auswertung wurde eine zweifaktorielle Kovarianzanalyse mit Messwiederholung über zwei Faktoren (mit der Baselinemessung B1 als Kovariable) durchgeführt. Die Messwiederholungsfaktoren waren zum einen die „Bedingung“ (Placebo- bzw. Medikamentenapplikation) und zum anderen die „Zeit“ (60, 150, 210, 255 Minuten nach Applikation). Abhängige Variable war die korrespondierende PRL-Konzentration. Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse.

**Tabelle 12:** Ergebnisse der zweifaktoriellen Kovarianzanalyse (Ausgangswert als Kovariate) mit den Faktoren „Bedingung“ (Placebo/Verum) und „Verlauf“ (60, 150, 210, 255 Minuten nach Substanzapplikation) bezogen auf die abhängige Variable „PRL-Konzentration“ im Serum in der gesamten Stichprobe.

Effekt	F	df	p
Medikamenteneffekt	11,88	1;38	0,001
Verlaufseffekt	0,79	3;114	n.s.
Medikament X Verlauf	6,07	3;114	0,001

Der Haupteffekt für den Faktor „Bedingung“ (Verum vs. Placebo) stellte sich als hochsignifikant heraus. Somit ist die mittlere PRL-Konzentration unter dex-Fenfluramin signifikant größer als unter Placebobedingungen. Ebenfalls konnte in der Kova-

rianzanalyse eine hochsignifikante Interaktion zwischen den Faktoren „Bedingung“ und „Verlauf“ bestimmt werden, d.h. dass mit dem Eintritt der Wirkung von dex-Fenfluramin eine signifikante Veränderung des Serumprolaktinspiegels zu sehen ist, die von der Placebobedingung abweicht

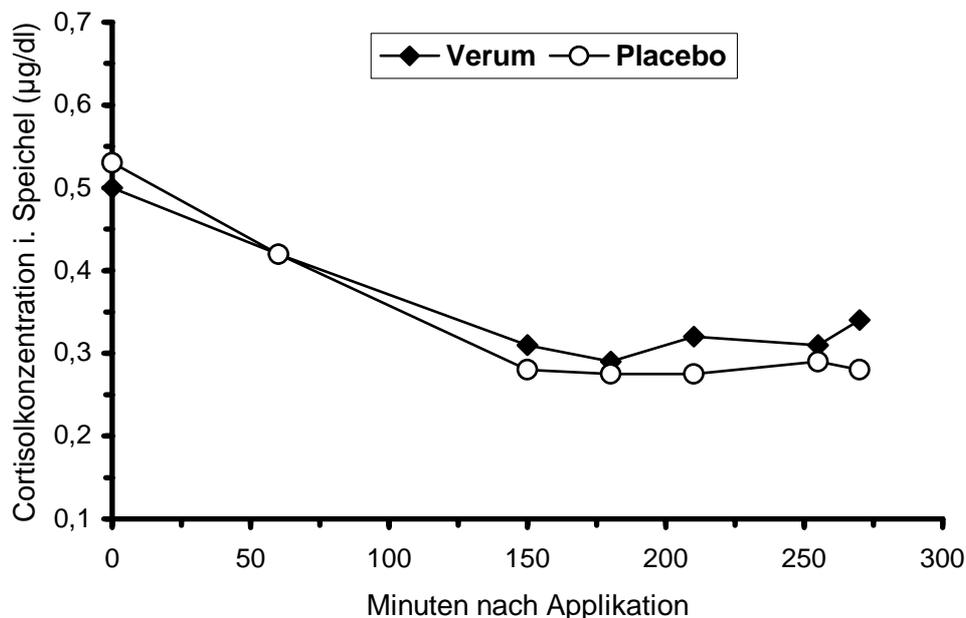
Nach Abbildung 18 kann man den Wirkeintritt des Pharmakons auf den Zeitraum um 16:30 Uhr legen, das entspricht dem Messzeitpunkt 150 min nach Einnahme von dex-Fenfluramin.

### 4.3 Die Veränderung des Cortisolwertes nach d-Fen im Speichel

Es ist möglich, die Konzentration von Cortisol sowohl im Blut als auch im Speichel zu messen. Nur freies Cortisol, also die biologisch aktive Form, kann vom Blut in den Speichel übergehen. Nach Wade (1992) stellt die Form der Speichelcortisolmessung ein gutes und nicht invasives Verfahren zur Messung der Veränderung der biologisch aktiven Cortisolform dar (s.a. Kap. 3.5.3).

Zunächst wurde untersucht, ob statistisch signifikante Unterschiede in den Baseline-Werten (B1) der Cortisolkonzentrationen unter Verum bzw. Placebo vorlagen. Dies war nicht der Fall, da die Mittelwerte unter beiden Bedingungen übereinstimmten. Somit konnte auf eine Baselinekorrektur verzichtet werden.

Die graphische Darstellung des Verlaufs der Cortisolkonzentrationen in der gesamten Stichprobe ist der Abbildung 19 zu entnehmen.



**Abbildung 20:** Verlauf der Mittelwerte der Cortisolkonzentration im Speichel unter den Bedingungen Verum (= dex-Fenfluramin) und Placebo zu den verschiedenen Messzeitpunkten bezogen auf die Gesamtstichprobe.

Wie schon bei PRL ist auch der höchste Cortisolwert zu Beginn der Untersuchung zu sehen. Im Anschluss daran zeigen die Werte eine abfallende Konzentration, die durch die circadiane Rhythmik hervorgerufen wird. Die Cortisoldurchschnittskonzentrationen unter Verumbedingungen liegen ab dem dritten Messzeitpunkt immer minimal über den Werten der Placeboapplikation. Jedoch ergibt die statistische Auswertung mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren „Bedingung“ und „Verlauf“ keine relevanten signifikanten Ergebnisse. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 wiedergegeben.

**Tabelle 13:** Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren „Bedingung“ (Placebo / Verum) und „Zeit“ (60, 150, 180, 210, 255, 270 Minuten nach Substanzapplikation) bezogen auf die abhängige Variable „Cortisol-Konzentration“ im Speichel in der gesamten Stichprobe.

Effekt	F	df	p
Medikamenteneffekt	2,79	1;38	n.s.
Verlaufseffekt	6,57	5;190	<0,001
Medikament X Verlauf	1,01	5;190	n.s.

Nur der Effekt des Verlaufs stellt sich als signifikant heraus. Der Medikamenteneffekt, (dex-Fenfluramin versus Placebo), ist statistisch nicht signifikant, ebensowenig wie die Interaktion von Medikament und Verlauf wie aus der Tabelle 13 hervorgeht.

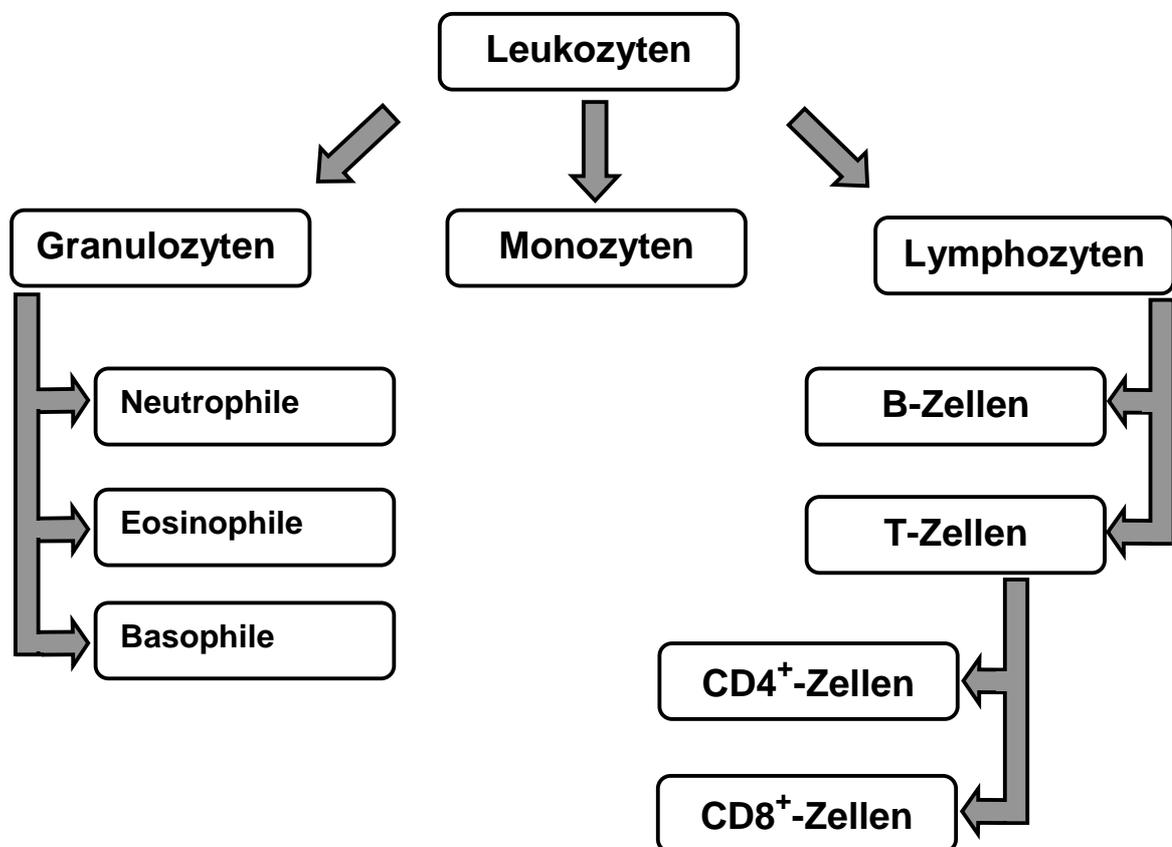
Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die durch dex-Fenfluramin ausgelösten endokrinen Veränderungen in dieser Dosierung zwar einen Einfluss auf PRL haben und von Bedeutung sind, nicht jedoch für das Hormon Cortisol, das im Vergleich zu Placebo keine signifikante Änderung in seiner Konzentration aufwies.

Die potentiell unterschiedlichen Auswirkungen auf die Änderungen der Anzahl von Lymphozyten im Serum der Probanden in den beiden Gruppen werden somit keine Folge der Veränderung der Cortisolkonzentration darstellen können. Somit kommt der beobachteten signifikanten Veränderung des PRL-Serumspiegels eine potentielle Rolle bei der anschließenden Betrachtung der Leukozytenmigration zu.

Im Folgenden werden nun die Anzahlen der einzelnen Zellen und Subtypen der peripheren Leukozyten im zeitlichen Verlauf näher dargestellt.

#### 4.4 Veränderung der absoluten Zahlen der peripheren Leukozyten und deren Subpopulationen nach serotonerger dex-Fenfluraminstimulation

Ausgehend von der Gesamtheit der Leukozyten sollen im Folgenden die wichtigsten Subpopulationen und ihre zahlenmäßigen Veränderungen durch ihr unterschiedliches Migrationsverhalten näher betrachtet werden. Die nachstehende Einteilung der Leukozyten in ihre Untergruppen, wie sie bereits in Abb. 15 (S.86) aufgezeigt wurde, soll als Hilfestellung bei den nun folgenden Ergebnisdarstellungen angesehen werden.



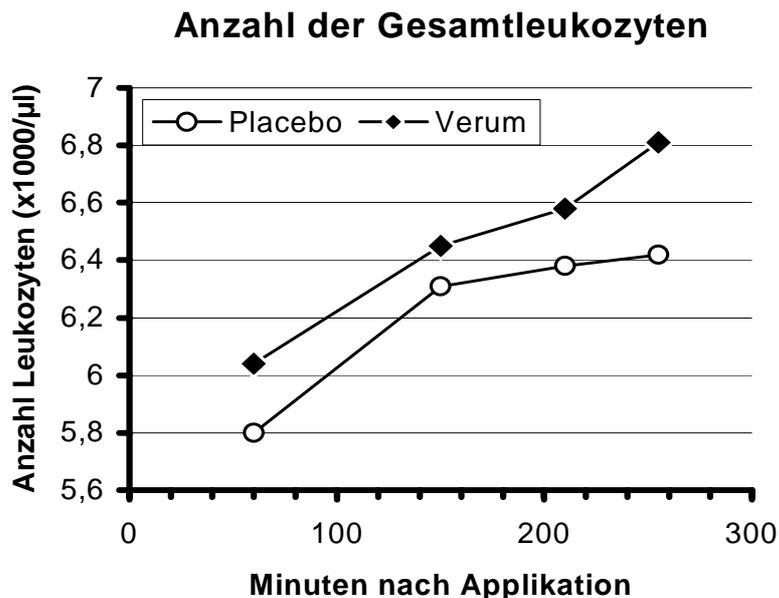
**Abbildung 21:** Aufgliederung der untersuchten Leukozyten

Der Verlauf der Anzahl an peripheren Leukozyten wurde ab der 60-Minuten-Baseline sowie an den weiteren Messzeitpunkten, wie in Abb.16, Kap. 3.6 angegeben, bestimmt. Aufgezeigt wird die absolute Anzahl, wie sie mit Hilfe der FAC-Scan Methode bestimmt wurde.

Die Verschiebungen innerhalb einer Zellpopulation und somit die prozentuale Änderung zur jeweils übergeordneten Gruppe werden gesondert im Kapitel 4.5 besprochen.

#### 4.4.1 Änderung der Gesamtzahl der peripheren Leukozyten nach zentraler serotonerger Stimulation durch dex-Fenfluramin

Zunächst einmal soll die gesamte Fraktion der Leukozyten betrachtet werden und davon ausgehend die einzelnen Zellgruppen wie oben dargestellt. Die Ergebnisse für die Verum- und Placebogruppe sind in Abbildung 22 wiedergegeben:



**Abbildung 22:** Anzahl der gesamten Leukozyten im Verlauf der Untersuchung zu den verschiedenen Messzeitpunkten unter Placebo- und Verum-Bedingungen. Angabe der Mittelwerte der Gesamtstichprobe in absoluten Zahlen  $\times 10^3/\mu\text{l}$ .

Ein signifikanter Ausgangswertunterschied ergab sich wiederum nicht. Die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse sind der folgenden Tab. 14 zu entnehmen:

**Tabelle 14:** Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung mit den Faktoren „Medikament“ (d-Fen/Placebo) und „Messzeitpunkt“ (60, 150, 210, 255 Minuten) und der abhängigen Variable „Gesamtleukozyten“:

Effekt	df	F	p
Medikamenteneffekt	1	0,398	n.s.
Verlaufseffekt	2,171	6,076	<0,05
Medikament X Verlauf	2,114	0,454	n.s.

In dem betrachteten Zeitrahmen von 60 min – 255 min nach steigen die Leukozyten in beiden Gruppen kontinuierlich an. Für einen Haupteffekt, genauso wie für die Interaktion von „Medikament X Verlauf“ ergibt sich aber keine Signifikanz. Nur der resultierende Effekt über den Messzeitpunkt stellt sich als signifikant heraus.

Allerdings verläuft der Anstieg der Mittelwerte der letzten beiden Messpunkte in der Verumgruppe steiler als der Anstieg unter Placebobedingungen.

Die durchschnittliche Zunahme der Leukozyten, bezogen auf die Baseline, beträgt am letzten Messzeitpunkt die in Tab. 15 angegebenen Werte:

**Tabelle 15:** Zunahme der Leukozyten ab Baseline

Maßeinheit	Placebo	Verum
in absoluter Zahl (/ $\mu$ l)	$0,624 \times 10^3/\mu\text{l}$	$0,773 \times 10^3/\mu\text{l}$
prozentual	+10,78 %	+12,80%

Wie zu sehen ist, unterscheiden sich die prozentualen Zuwächse vom Ausgangswert zum letzten Messzeitpunkt hin kaum voneinander. Auffallend ist somit lediglich der in der Schlussphase (vorletzter zu letzter Wert) unterschiedlich steile Anstieg in der Leukozytenzahl.

#### **4.4.2 Änderung der Granulozytenfraktion nach serotonerger Stimulation durch dex-Fenfluramin**

Der größte Anteil an der Masse der Leukozyten wird durch die Granulozyten mit ca. 60% gebildet. Von den drei gemessenen Untergruppen stellen die Neutrophilen a) gegenüber den Eosinophilen b) und Basophilen c) bei weitem den mächtigsten Anteil der Granulozyten dar. Sie werden nun in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit a)-c) dargestellt (s. Abb. 23a, 23b u. 23c)

Abb. 23a:

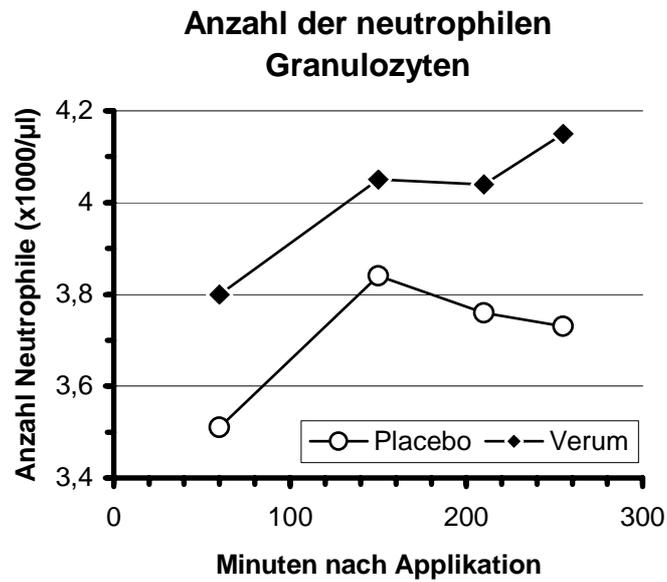


Abb. 23b:

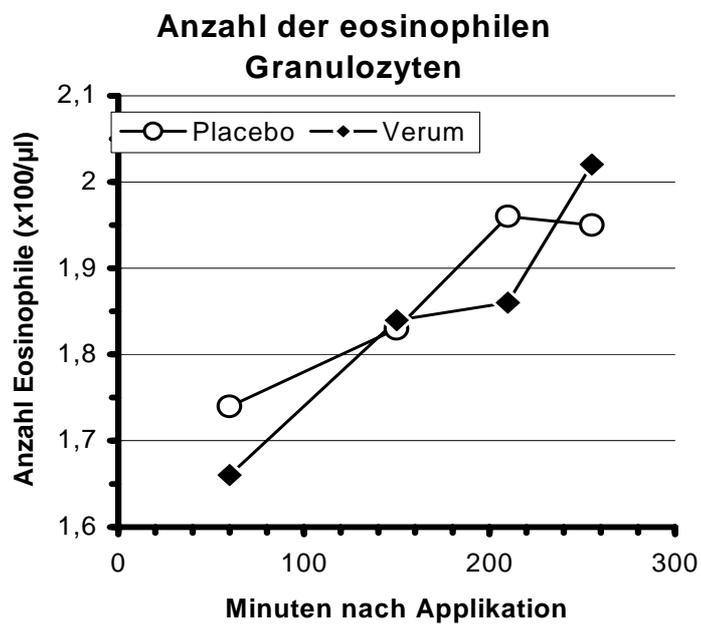
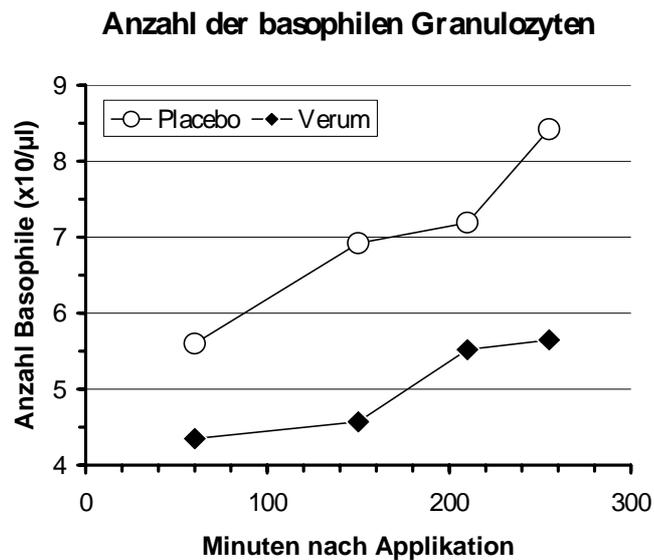


Abb. 23c:



**Abbildung 23 a-c:** Mittelwerte der gesamten Stichprobe der absoluten Anzahlen an a) neutrophilen, b) eosinophilen und c) basophilen Zellen zu den vier Messzeitpunkten (60 min, 150 min, 210 min, 255 min) nach Applikation von dex-Fenfluramin bzw. Placebo. (Beachte: Unterschiedliche Einheiten der Zehnerpotenzen der Zellzahlen auf den Ordinaten!)

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zur Überprüfung auf Signifikanz der oben gezeigten Ergebnisse zeigt die Tabelle 16:

**Tabelle 16:** Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung und den Faktoren „Medikament“ (Placebo/d-Fen) und „Verlauf“ der absoluten Zellzahlen der a) neutrophilen, b) eosinophilen und c) basophilen Granulozyten

Granulozyten	Effekt	df	F	p
a) Neutrophile	Medikamenteneffekt	1,000	0,274	n.s.
	Verlaufseffekt	1,923	9,872	<0,001
	Medikament X Verlauf	1,968	0,479	n.s.
b) Eosinophile	Medikamenteneffekt	1,000	5,783	<0,05
	Verlaufseffekt	2,109	2,716	<0,1
	Medikament X Verlauf	2,822	2,070	<0,1
c) Basophile	Medikamenteneffekt	1,000	1,169	n.s.
	Verlaufseffekt	2,750	2,810	<0,05
	Medikament X Verlauf	2,609	1,269	n.s.

Bei den Neutrophilen zeigen sich zu Beginn sowohl unter Placebo als auch unter der Verum-Bedingung ein starker Anstieg der Zellzahlen. Unter dex-Fenfluramin setzt sich dann dieser Anstieg fort, während unter der Placebobedingung ein leichtes Absinken der Neutrophilen im Blut zu beobachten ist.

Die Überprüfung der Signifikanzniveaus der Neutrophilen ergibt lediglich für den Verlauf einen signifikanten Wert. Der Einfluss von dex-Fenfluramin reicht jedoch nicht aus, um einen statistisch signifikanten Unterschied zu erzielen. Ebenfalls wird die Interaktion von „Medikament X Verlauf“ nicht signifikant.

Ähnliches gilt für die Basophilenzahlen. Sie steigen unter beiden Bedingungen an, unter Verum zum Ende hin dann stärker als unter Placebo. Aber weder für „Medikament“ noch für die Interaktion mit „Verlauf“ ergeben sich statistisch signifikante Unterschiede.

Anders verhält es sich bei den Eosinophilen, für die sich ein signifikanter Medikamenteneffekt ergibt. Für den Verlaufseffekt und die Interaktion „Medikament X Verlauf“ zeichnen sich noch Tendenzen bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,1$  ab. Das bedeutet einen unter dem Einfluss von dex-Fenfluramin signifikant größere Anzahl an Eosinophilen in der Zirkulation als unter Placebo. Außerdem zeigt sich eine tendenziell unterschiedliche Veränderung der Eosinophilen für die Verum- und Placebobedingung. Der „Verumzellanstieg“ ist dabei deutlich stärker ausgeprägt ( $>20\%$  zur Baseline) als der vorhandene Anstieg unter Placebo (ca.10%).

Auch hier zeigen sich die markanten Unterschiede hinsichtlich der Medikation erst gegen Ende der Untersuchung, wie dies ebenfalls in der Gruppe der Basophilen ab 210 min bzw. der Neutrophilen ab 155 min sichtbar wurde. Die prozentuale Veränderung der letzten drei Messwerte gegenüber dem Baselinewert in der Verum- und Placebogruppe zeigen die folgenden Abbildung 24a, 24b u. 24c:

Abb. 24a:

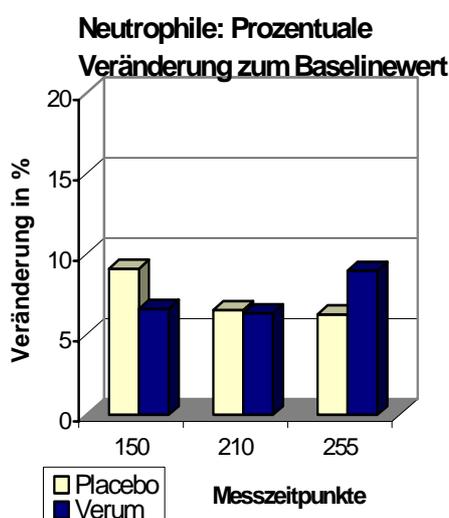


Abb. 24b:

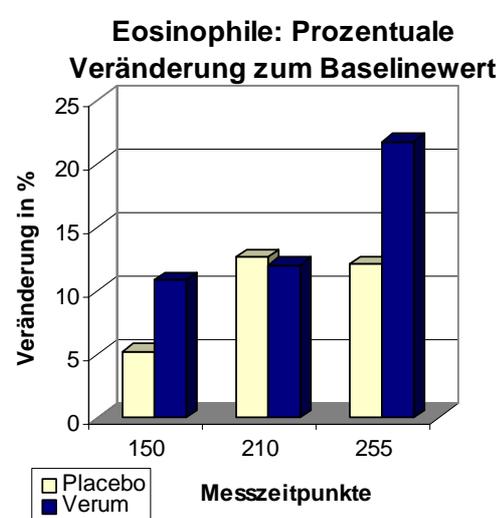
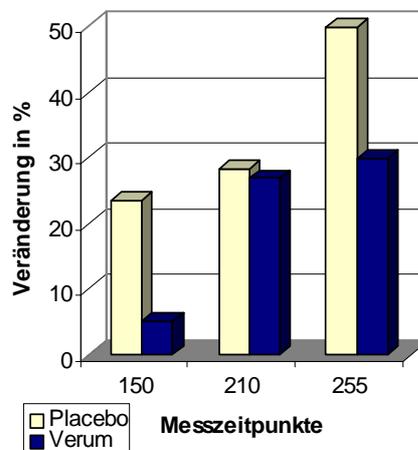


Abb. 24c:

**Basophile: Prozentuale Veränderung zum Baselinewert**

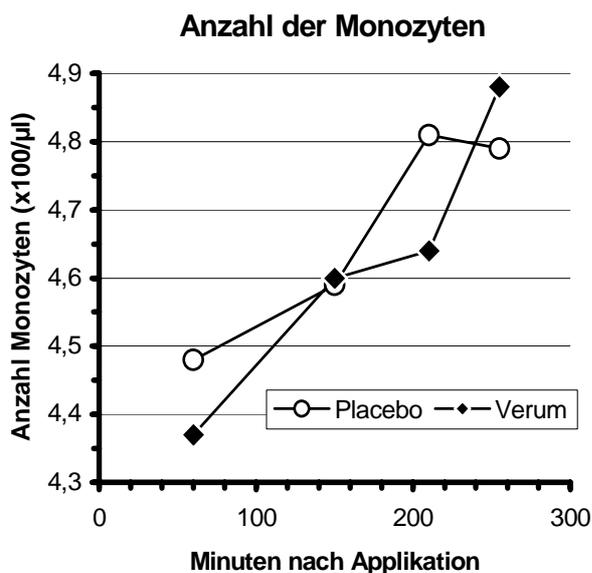
**Abbildungen 24a-c:** Prozentuale Veränderungen der neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten zum jeweiligen Baselinewert, bestimmt aus den Mittelwerte der Gesamtstichprobe.

Ein interessanter Aspekt ist bei den Zellzahlen der Basophilen zu beobachten. Unter Verumbedingungen kommt es zwar zu einem ca. 30-prozentigem Anstieg, jedoch wird unter Placebobedingungen eine Zunahme der Zellzahlen um fast 50 % erreicht. Die Basophilen zeigen somit gegenüber den anderen Granulozyten eine gegenläufige Tendenz, dass eine serotonerge Stimulation den zirkadianen Anstieg bremst.

#### **4.4.3 Änderung der absoluten Anzahl der Monozyten unter einer serotonergen Stimulation mit dex-Fenfluramin**

Eine verstärkte Zunahme der Zahl der zirkulierenden Monozyten im Blut konnte unter einer zentralen serotonergen Stimulation gezeigt werden.

Folgende Änderungen in der Monozytenpopulation wurden nach Einnahme von dex-Fenfluramin erzielt (s.Abb. 25):



**Abbildung 25:** Anzahl der Monozyten zu den vier Messzeitpunkten unter den Bedingungen Placebo und d-Fen. Angegeben sind die Mittelwerte der Gesamtstichprobe.

**Tabelle 17:** Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung für die Anzahl der Monozyten im Blut mit den beiden Faktoren „Medikament“ und „Verlauf“.

Effekt	df	F	p
Medikamenteneffekt	1,000	5,780	<0,05
Verlaufseffekt	2,307	6,525	<0,001
Medikament X Verlauf	2,637	1,896	<0,1

Sowohl unter der dex-Fenfluraminbedingung als auch unter der Placebobedingung erkennt man Zunahmen der Zellzahlen zu Beginn des beobachteten Zeitfensters. Jedoch tritt dann zum Ende hin ein deutlicher Unterschied auf, der sich in einem extremen Anstieg unter Verum und gleichzeitig einem Absinken unter Placebo verdeutlicht. Es resultiert schließlich gegenüber Baseline ein ca. 12-prozentiger Anstieg unter d-Fen gegenüber einem ca. 6-prozentigem Anstieg in der zirkadianen Rhythmik.

So errechnet sich ein signifikanter Haupteffekt für dex-Fenfluramin bei einem ebenfalls signifikanten Verlaufseffekt. Für die Interaktion der beiden Effekte, ergibt sich noch ein schwach signifikant unterschiedlicher Verlauf, wie er aus Abb. 25 sichtbar wird.

Wie schon bei den Granulozyten beobachtet, heben sich auch hier die Unterschiede zwischen Verum und Placebo erst zum Ende der Untersuchung hin deutlich ab. Vom Messzeitpunkt 255 min an kommt es zu einem deutlich divergenten Verlauf der beiden Kurven.

#### 4.4.4 Änderung der absoluten Anzahl der Lymphozyten unter serotonerger Stimulation mit dex-Fenfluramin

##### 4.4.4.1 Änderung der Gesamt-, B- und T-Lymphozyten

Nach den Granulozyten und Monozyten sollen nun die unterschiedlichen Lymphozyten in ihrem Verhalten auf eine Stimulation durch den 5-HT-Reuptakeinhibitor und -Releaser dex-Fenfluramin genauer untersucht werden.

Für die gesamte Gruppe der Lymphozyten konnten die folgenden Zellzahlveränderungen festgestellt werden (Abb. 26a-c):

Abb. 26a:

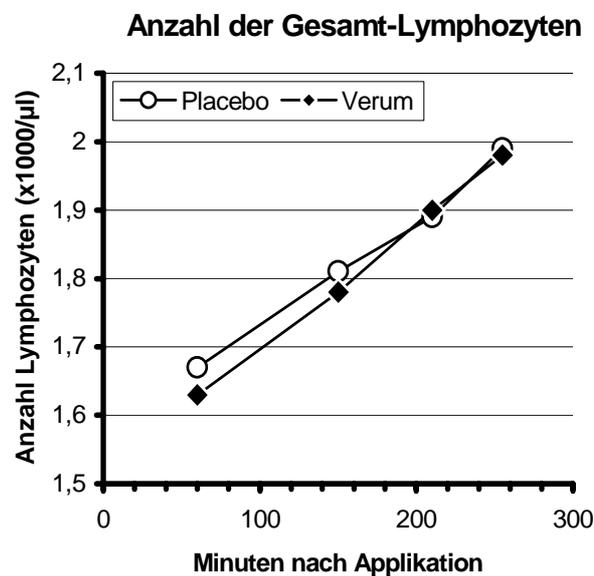


Abb. 26b:

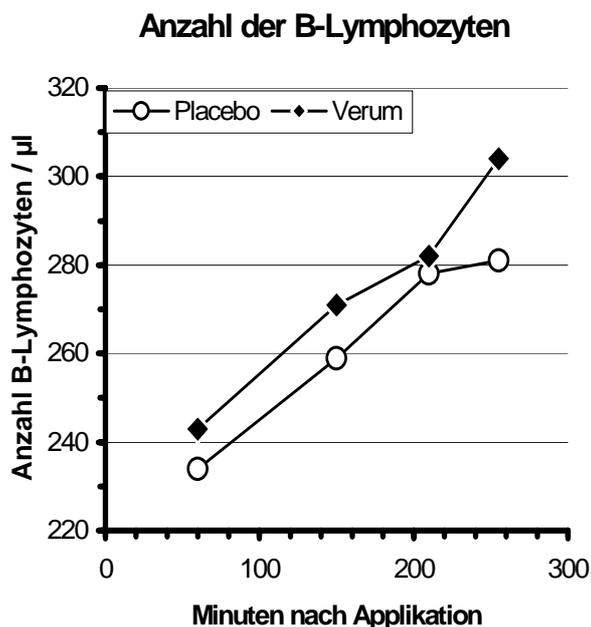
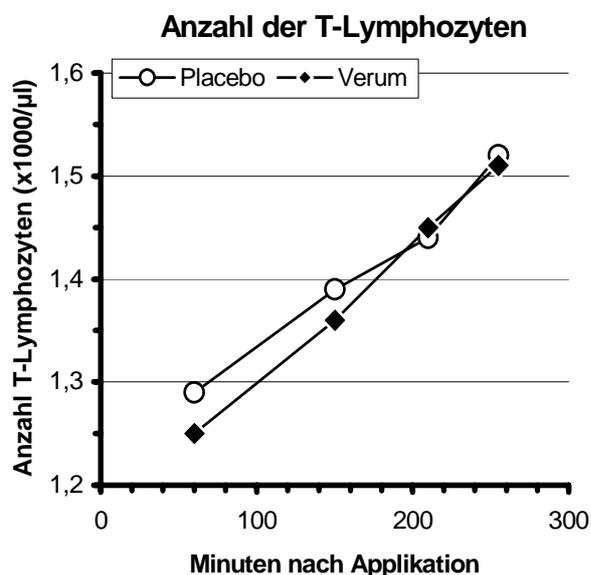


Abb. 26c:



**Abbildungen 26a-c:** Veränderungen unter der Wirkung von dex-Fenfluramin vs. Placebo zu den verschiedenen Messzeitpunkten für a) die gesamte Population der Lymphozyten und b) ihre Subpopulation von B-Lymphozyten und c) T-Lymphozyten. (Beachte: Unterschiedliche Skalierung der Ordinate.)

**Tabelle 18:** Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung und den beiden Faktoren „Medikament“ (d-Fen/Placebo) und „Verlauf“ (Messzeitpunkte 60, 155, 210, 255 min) für die gesamten Lymphozyten, die B-Zellen ( $\text{CD}19^+$ ) und die T-Zellen ( $\text{CD}3^+$ ).

Zellgruppe	Effekt	df	F	p
Lymphozyten gesamt	Medikamenteneffekt	1,000	0,001	n.s.
	Verlaufseffekt	0,461	2,995	<0,05
	Medikament X Verlauf	2,514	0,885	n.s.
T-Lymphozyten	Medikamenteneffekt	1,000	0,478	n.s.
	Verlaufseffekt	2,344	5,987	<0,05
	Medikament X Verlauf	2,522	0,993	n.s.
B-Lymphozyten	Medikamenteneffekt	1,000	0,821	n.s.
	Verlaufseffekt	2,366	1,509	n.s.
	Medikament X Verlauf	2,536	0,480	n.s.

Wie bereits in der Grafik (Abb. 26) deutlich erkennbar ist, lässt sich hier kein Effekt des Pharmakons dex-Fenfluramin auf die Anzahl der Zellen feststellen. Es resultiert bei allen Lymphozyten sowohl ein Anstieg unter der Bedingung Placebo als auch unter Verum. Dies schlägt sich auch in einer Insignifikanz hinsichtlich des Unterschiedes des Medikamenteneffekts in der Berechnung nieder, wie der Tabelle 18 zu entnehmen ist.

Auch hier sollen die prozentualen Veränderungen gegenüber der Baselinemarke noch einmal graphisch dargestellt werden (Abb.27a-c):

Abb. 27a:

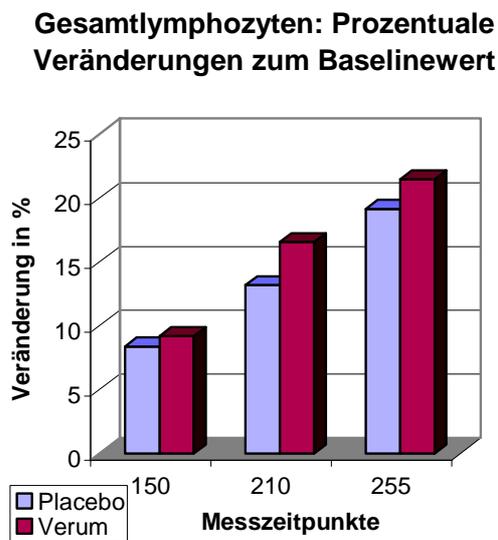


Abb. 27b:

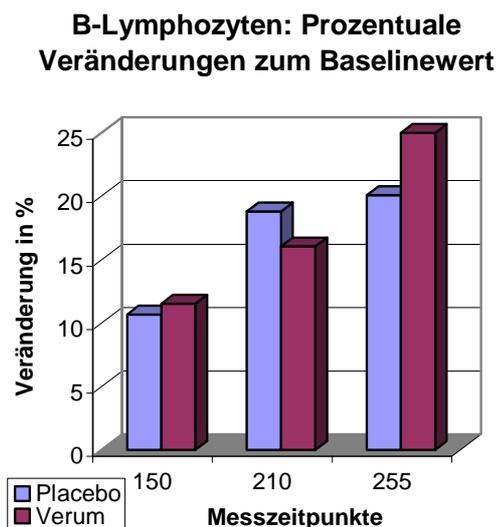
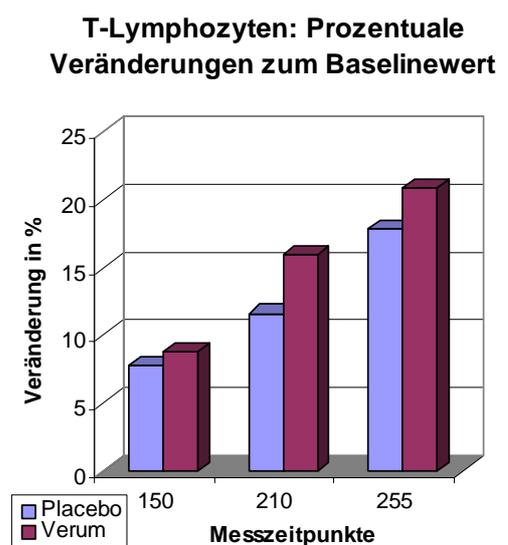


Abb. 27c:

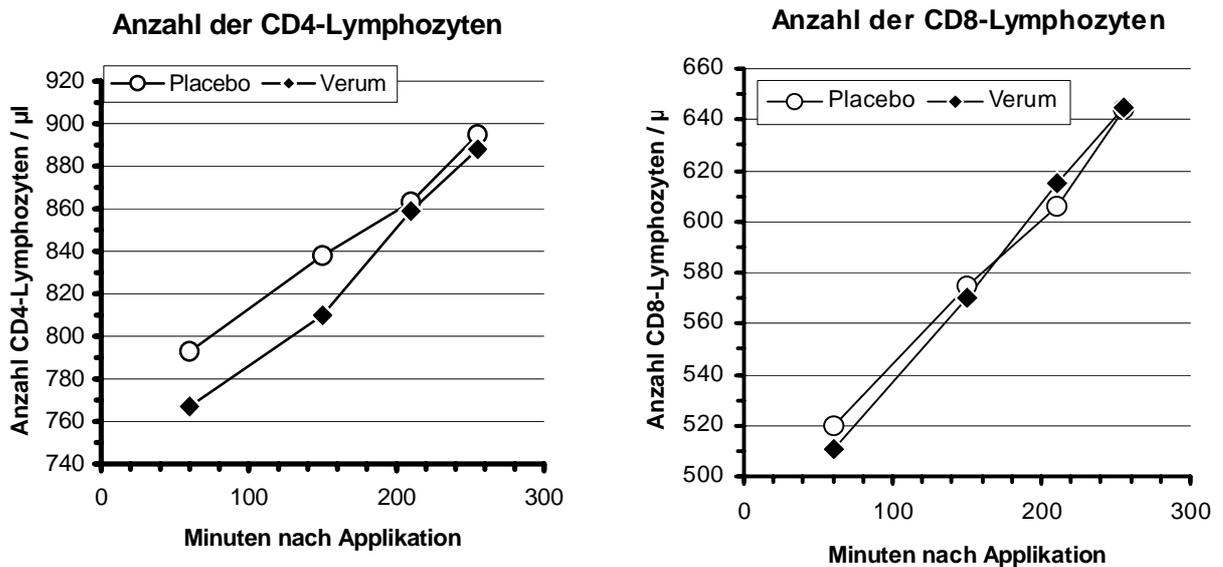


**Abbildungen 27a-c:** Die prozentualen Zunahmen der Lymphozyten (gesamt, B- und T-Zellen jeweils getrennt) gegenüber dem Baselinewert „60 min“ in vergleichender Darstellung bzgl. Verum- und Placeboapplikation.

Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, erreichen die max. Zunahmen unter beiden Bedingungen für die Lymphozyten Werte im Bereich von ca. 20-25 %. Es sind im Mittel geringfügig größere Zunahmen unter der Verumapplikation zu beobachten als in der Placebogruppe. Ansonsten verhalten sich die Anstiege der Lymphozytenzahlen im zirkulierenden Blut konform der zirkadianen Rhythmik.

#### 4.4.4.2 Änderung der CD4+- und CD8+-Lymphozyten

Die Gruppe der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen soll nun etwas genauer untersucht werden, indem sie in ihre Subpopulationen, die T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) und die zytotoxischen/-Suppressor-Zellen (CD8<sup>+</sup>) aufgeteilt wird. Da diese Zellen Unterschiede in ihren Aufgaben im Organismus, in ihren Oberflächenmarkern und -rezeptoren aufweisen, wird im Folgenden ihr Migrationsverhalten auf die zentrale serotonerge Stimulation mittels dex-Fenfluramin genauer betrachtet. Abbildung 28 zeigt die Änderungen der Anzahl an peripheren Zellen im Blut unter beiden Bedingungen:



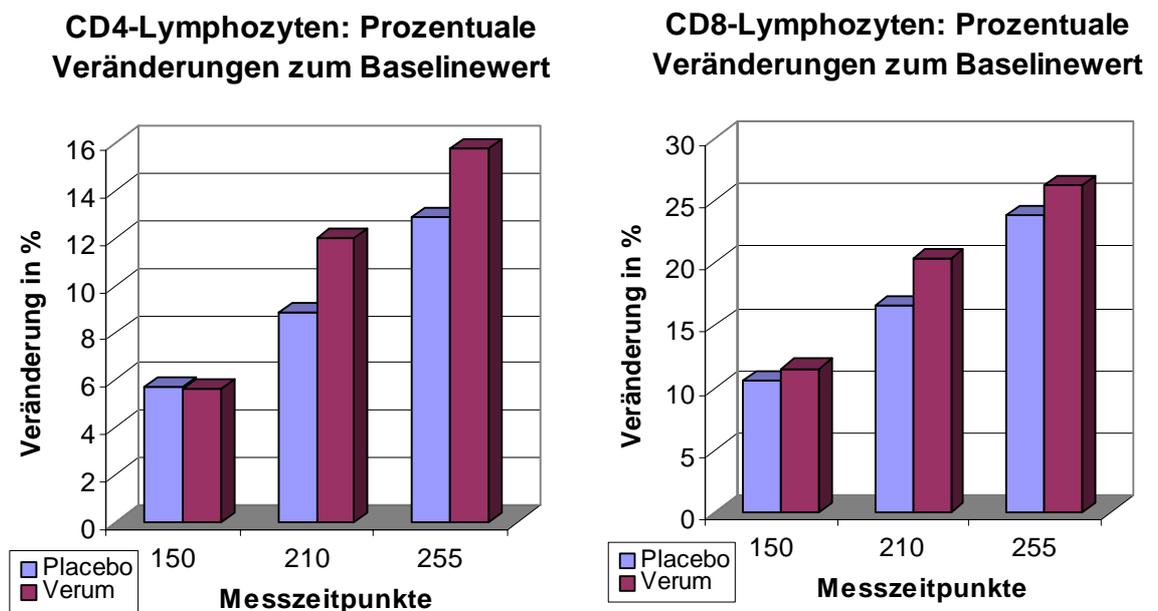
**Abbildung 28:** Anstieg der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen nach d-Fen bzw. Placebo im zeitlichen Verlauf als Mittelwerte der Gesamtstichprobe.

**Tabelle 19:** Zweifaktorielle Kovarianzanalyse mit Messwiederholung und den beiden Faktoren „Medikament“ und „Verlauf“ der beiden T-Lymphozyten-Subpopulationen von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen.

T-Lymphozyten	Effekt	df	F	p
CD4 <sup>+</sup> -Zellen	Medikamenteneffekt	1,000	0,490	n.s.
	Verlaufseffekt	2,484	6,074	<0,05
	Medikament X Verlauf	2,595	0,388	n.s.
CD8 <sup>+</sup> -Zellen	Medikamenteneffekt	1,000	0,014	n.s.
	Verlaufseffekt	2,321	1,212	n.s.
	Medikament X Verlauf	2,535	0,891	n.s.

Abbildung 28 und Tabelle 19 zeigen deutlich, dass sich kein signifikanter Medikamenteneffekt einstellt, wie es schon bei den B- und T-Zellen und der gesamten Lymphozytenpopulation zu sehen war. Somit zeigt auch hier dex-Fenfluramin keinen Einfluss auf die Anzahl der im peripheren Blut vorhandenen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen im beobachteten Zeitfenster.

Betrachtet man die prozentualen Zunahmen vom Baselinewert (Abb.29), erreichen die CD4<sup>+</sup>-Zellen Zunahmen um die 15%, die CD8<sup>+</sup>-Zellen mit Werten um 25% etwas mehr.



**Abbildung 29:** Die prozentualen Zunahmen der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-Zellen gegenüber dem Baselinewert „60 min“ in vergleichender Darstellung bzgl. Verum- und Placeboapplikation.

#### **4.5 Änderung der prozentualen Zusammensetzung der Leukozyten nach serotonerger Stimulation durch dex-Fenfluramin**

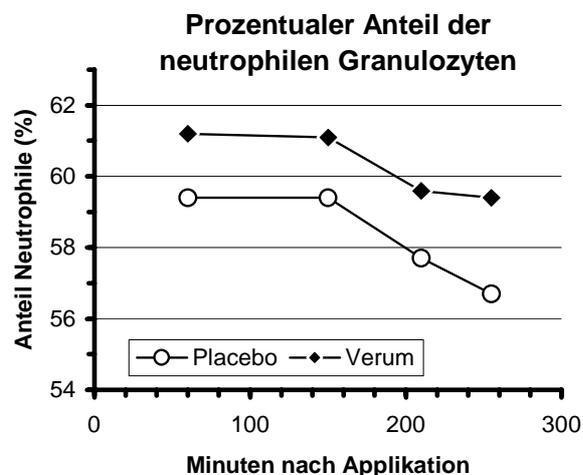
Da die Veränderung der absoluten Zahlen der einzelnen Leukozytensubpopulationen auch immer abhängig ist von der Zahl der im betrachteten Messzeitpunkt absoluten Zahl an Leukozyten, ist es sinnvoll, den prozentualen Anteil der einzelnen Zelltypen zu betrachten. Denn unter einer gleichbleibenden Anzahl von Zellen, kann es zu Verschiebungen zwischen den jeweiligen Subpopulationen kommen.

Wie in der Literatur und im klinischen Gebrauch üblich, sollen folgende prozentuale Verhältnisse beleuchtet werden:

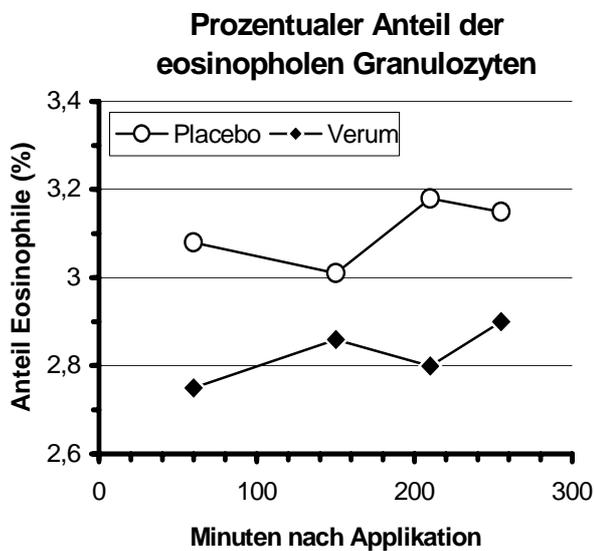
Die neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten (Abb. 30a-c), die Monozyten (Abb. 31) und die Lymphozyten (Abb. 32) sollen sich dabei auf die gesamte Zahl aller weißen Blutkörperchen beziehen. Die Untergruppen der Lymphozyten, also B- und T-Lymphozyten (Abb. 33) auf die gesamten Lymphozyten. Die prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Zellen (Abb. 34) beziehen sich auf die Zahl der T-Lymphozyten.

##### **4.5.1 Änderung des prozentualen Anteils der neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten an der Zahl der gesamten Leukozyten**

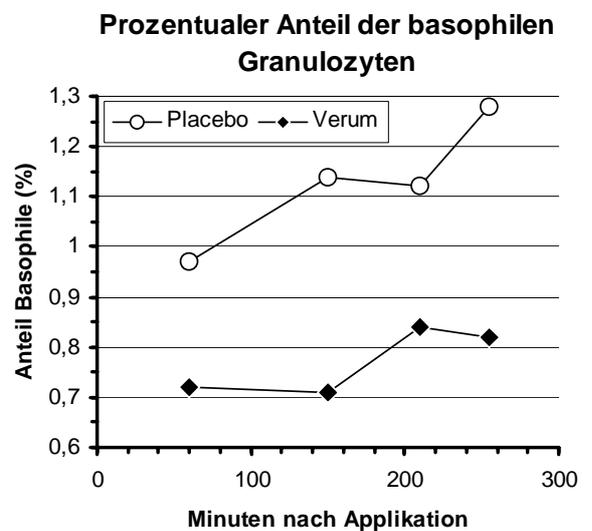
Abb 30a:



b)



c)



**Abbildungen 30a-c:** Prozentuale Anteile der Neutrophilen (a), Eosinophilen (b) und Basophilen (c) jeweils bezogen auf die Gesamtleukozytenzahl zum korrespondierenden Messzeitpunkt. Angaben in %. (Beachte: unterschiedlich skalierte Ordinaten).

Die statistische Berechnung auf signifikante Unterschiede in der Entwicklung der prozentualen Anteile der Granulozyten nach dex-Fenfluramin bzw. nach Placebo wird in der nachfolgenden Tabelle 20 dargestellt:

**Tabelle 20:** Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung und den beiden Faktoren „Medikament“ und „Verlauf“ für die prozentuale Zusammensetzung der Subpopulationen der Granulozyten

Granulozyten	Effekt	df	F	p
a) Neutrophile	Medikamenteneffekt	1,000	0,015	n.s.
	Verlaufseffekt	2,192	3,891	<0,05
	Medikament X Verlauf	2,145	0,080	n.s.
b) Eosinophile	Medikamenteneffekt	0,127	0,217	n.s.
	Verlaufseffekt	2,299	2,620	<0,1
	Medikament X Verlauf	3,000	2,130	<0,1
c) Basophile	Medikamenteneffekt	1,000	0,632	n.s.
	Verlaufseffekt	1,752	1,480	n.s.
	Medikament X Verlauf	1,984	0,831	n.s.

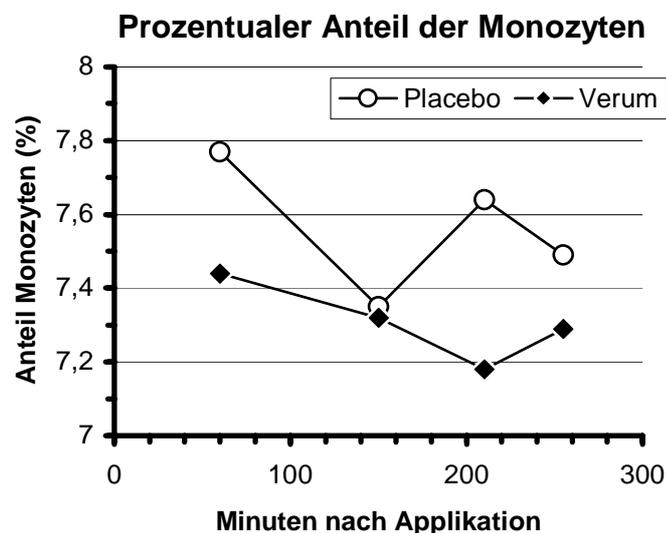
Trotz eines Anstiegs der gesamten Neutrophilen als absoluter Wert, (s. Abb. 23a) nimmt der Anteil der Neutrophilen bezogen auf die gesamte Leukozytenpopulation ab. Diese Abnahme erfolgt sowohl unter der Bedingung Placebo als auch unter der Verumbedingung.

Im Gegensatz dazu steigen die prozentualen Anteile der Eosinophilen und Basophilen an, ihr Anteil wird also in der Gesamtenpopulation größer.

Hinsichtlich eines Unterschiedes in der Medikationsauswirkung lassen sich lediglich in der Gruppe der eosinophilen Granulozyten Tendenzen feststellen hin zu einer stärkeren prozentualen Zunahme in der Verumgruppe. Dieser Effekt konnte bereits unter den absoluten Zahlen (s. Tab. 16) festgestellt werden. Alle anderen Granulozyten zeigen keine Tendenzen oder Signifikanzen bezüglich eines Medikamenteneffekts.

#### **4.5.2 Änderung des prozentualen Anteils der Monozyten an der Zahl der gesamten Leukozyten**

Nach dem signifikanten Anstieg der absoluten Anzahl der Monozyten unter Verumbedingungen (s. Tab. 17) soll nun überprüft werden, ob sich diese Zunahme auch in einem gesteigerten prozentualen Anteil der Monozyten bezogen auf die gesamten Leukozyten niederschlägt. Siehe dazu die folgende Abbildung 31 und Tabelle 21:



**Abbildung 31:** Darstellung des prozentualen Anteils der Monozyten in Beziehung zur gesamten Zahl der Leukozyten unter den Bedingungen Verum (dex-Fenfluramin) und Placebo. Angaben in %.

Die statistischen Ergebnisse hinsichtlich eines signifikanten Unterschiedes in den Gruppen sind der Tab. 21 zu entnehmen.

**Tabelle 21:** Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung für die Faktoren „Medikament“ (d-Fen/Placebo) und „Verlauf“ für die prozentualen Anteile der Monozyten

Effekt	df	F	p
Medikamenteneffekt	1,000	4,812	<0,05
Verlaufseffekt	2,446	7,702	<0,001
Medikament X Verlauf	2,560	1,830	<0,1

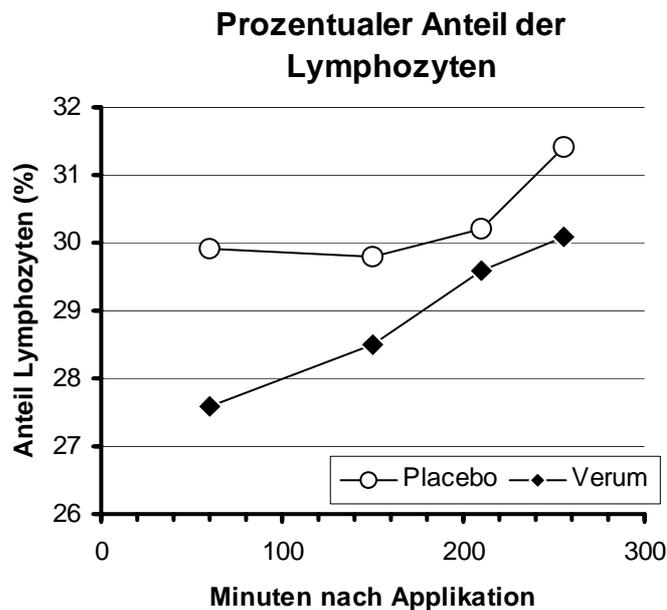
Trotz eines Anstiegs der absoluten Zahlen der Monozyten reicht dies nicht aus, um auch innerhalb der Gesamtleukozyten einen höheren prozentualen Anteil zu erreichen. Der prozentuale Anteil nimmt im Verlauf der Untersuchung ab.

Jedoch ist die Abnahme unter Placebobedingungen signifikant stärker als unter dex-Fenfluramin. Auch in der Interaktion von Medikament und Verlauf kann noch eine Tendenz ermittelt werden, also eines unterschiedlichen Verlaufes von dex-Fenfluramin und Placebo, wie er in Abb. 31 deutlich wird.

#### **4.5.3 Änderung des prozentualen Anteils der Lymphozyten an der Zahl der gesamten Leukozyten**

Unter Betrachtung der absoluten Zahlen konnte eine Zunahme der Zellen unter beiden Bedingungen beobachtet werden. Es bestand jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit.

Die folgende Abbildung 32 zeigt nun die Auswirkungen auf den prozentualen Anteil an der Gesamtleukozytenpopulation.



**Abbildung 32:** Prozentualer Anteil der gesamten Lymphozyten an den Leukozyten zu den jeweiligen korrespondierenden Messzeitpunkten unter d-Fen- und Placebobedingung im Vergleich. Angegeben sind die Mittelwerte der Gesamtstichprobe.

Die Auswertung mit der zweifaktoriellen Kovarianzanalyse mit Messwiederholung liefert die in Tab. 22 gezeigten Ergebnisse.

**Tabelle 22:** Zweifaktorielle Kovarianzanalyse (Ausgangswert als Kovariable) mit Messwiederholung für die Faktoren „Medikament“ (d-Fen/Placebo) und „Verlauf“ der gesamten Stichprobe für den prozentualen Anteil der Lymphozyten

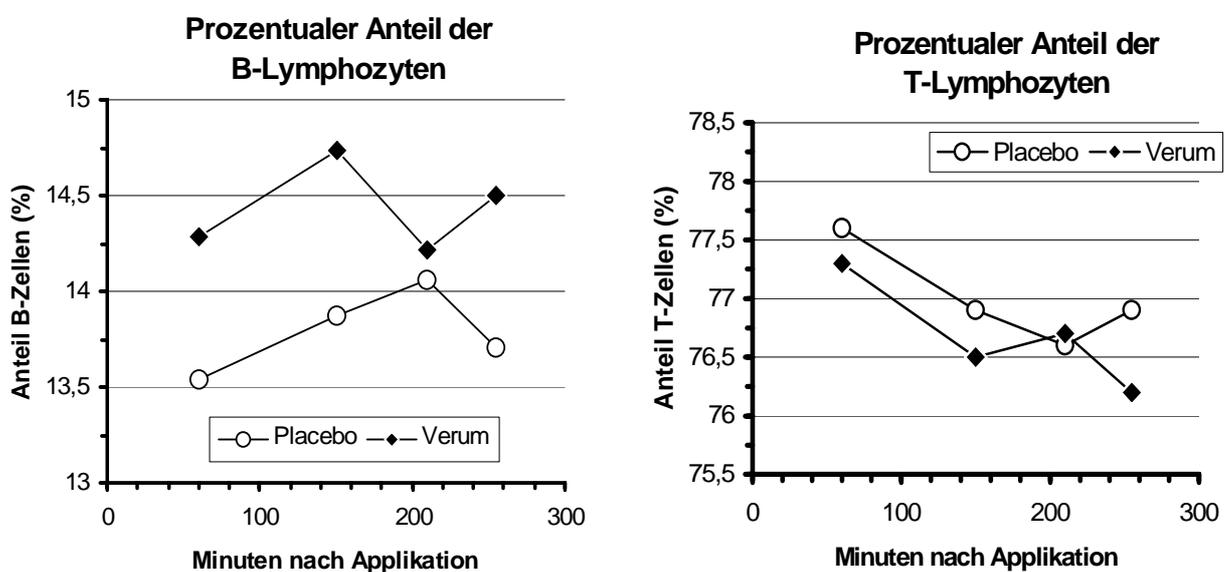
Effekt	df	F	p
Medikamenteneffekt	1,000	2,065	<0,1
Verlaufseffekt	2,726	7,903	<0,001
Medikament X Verlauf	2,472	1,981	<0,1

Abbildung und Tabelle zeigen, dass es trotz der gestiegenen Gesamtleukozytenzahlen, bei der prozentualen Betrachtung zu einem Anstieg der Lymphozyten innerhalb der Leukozyten auf prozentualer Ebene zuungunsten anderer Zellen kommt. Dabei zeigt sich ein etwas stärkerer Anstieg unter der Verumbedingung als unter der Placeboapplikation, was sich in einem schwach signifikanten Niveauunterschied

niederschlägt. Dies ist sowohl für den Medikamenteneffekt, also der Wirkung von dex-Fenfluramin, als auch für die Verlaufsunterschiede der Fall.

#### 4.5.3.1 Änderung des prozentualen Anteils der T- und B-Lymphozyten an der Zahl der gesamten Lymphozyten

Als Nächstes soll untersucht werden, welche Subpopulation bei dem leichten Anstieg des Lymphozytenanteils mehr beteiligt ist. Dazu werden die T- und B-Zellen separat betrachtet, was in der folgenden Abbildung 33 zu sehen ist.



**Abbildung 33:** Prozentuale Veränderung der B- und T-Zellen bezogen auf die gesamte Zahl der Lymphozyten. Darstellung der gemittelten Werte über die gesamte Stichprobe.

Wie man hier erkennt, verhalten sich die B- und T-Zellanteile innerhalb der Lymphozyten unterschiedlich. Während die Mittelwerte der prozentualen Anteile der T-Zellen einem Abwärtstrend folgen, weisen die B-Zellen einen konstanten bis leicht zunehmenden prozentualen Anteil für die Mittelwerte auf.

Die statistische Berechnung auf Signifikanz bezüglich eines Verum-Placebo-Unterschieds mit Hilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse führt zu den folgenden Werten (Tab. 23):

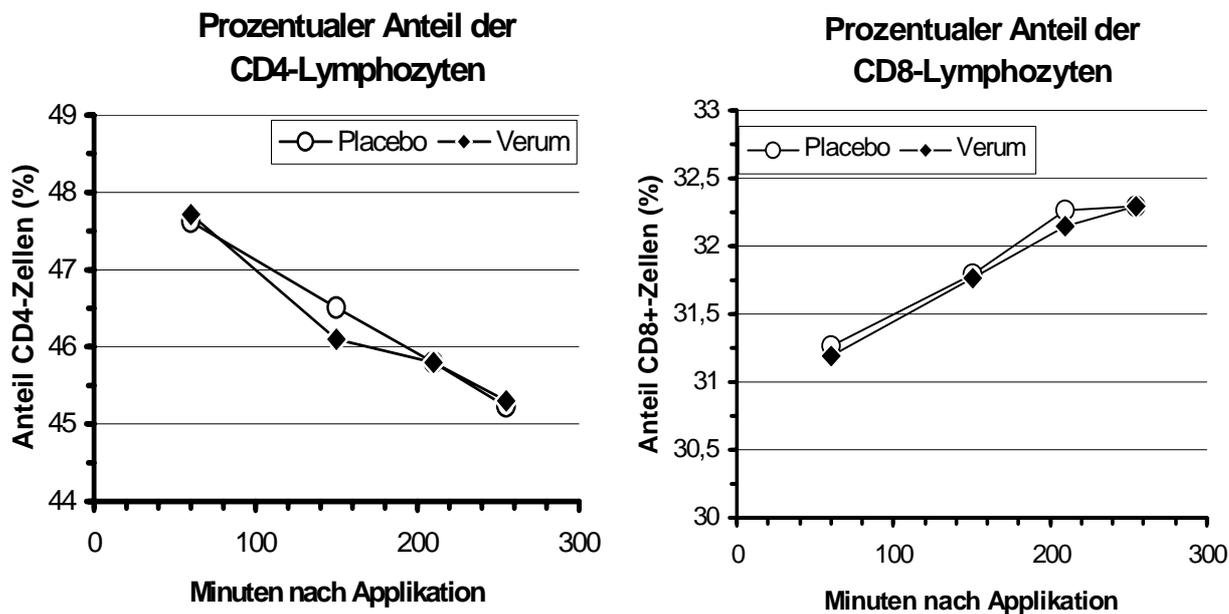
**Tabelle 23:** Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung für die Faktoren „Medikament“ (d-Fen/Placebo) und „Verlauf“ der gesamten Stichprobe der B- und T-Zellen

Lymphozyten	Effekt	df	F	p
T-Lymphozyten	Medikamenteneffekt	1,000	0,001	n.s.
	Verlaufseffekt	2,739	0,169	n.s.
	Medikament X Verlauf	2,638	0,810	n.s.
B-Lymphozyten	Medikamenteneffekt	1,000	0,156	n.s.
	Verlaufseffekt	2,636	2,165	<0,1
	Medikament X Verlauf	2,690	1,348	n.s.

Die Signifikanzberechnung bezüglich eines Medikamentenunterschiedes zeigt keinen substantiellen Gruppenunterschied, weder für die T- noch für die B-Lymphozyten, wie aus der Tabelle hervorgeht. D.h., dass eine serotonerge Stimulation mittels dex-Fenfluramin nicht mit einer Veränderung dieser Zellanteile einhergeht.

#### **4.5.3.2 Änderung des prozentualen Anteils der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen zur Zahl der gesamten T-Lymphozyten**

Auch der leicht reduzierte Anteil der T-Lymphozyten innerhalb der Lymphozyten lässt sich noch weiter auftrennen durch Betrachtung der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Subpopulationen. Ihr prozentualer Anteil stellt sich wie folgt als Anteil der T-Zellpopulation dar (Abbildung 34).



**Abbildung 34:** Veränderungen der prozentualen Anteile über die Zeit der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen auf die Zahl der T-Lymphozyten zum jeweils korrespondierenden Messzeitpunkt (Beachte: Unterschiedlich skalierte Ordinaten).

Wie es sich aus der Logik der Berechnung ergibt, verlaufen die prozentualen Anteile der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen in gegensätzlicher Richtung. Bei einem Abfall der CD4-Zellen von ca. 48% auf 45% der T-Zellen kommt es gleichermaßen spiegelbildlich zu einem Ansteigen der Prozentwerte der CD8<sup>+</sup>-Zellen als Ausgleich.

Die statistischen Berechnungen mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse ergeben weder für „Medikament“ noch für „Verlauf“ oder die Interaktion der beiden Faktoren signifikante Effekte zwischen dex-Fenfluramin und Placebo (Tab. 24).

**Tabelle 24:** Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung für die Faktoren „Medikament“ (d-Fen/Placebo) und „Verlauf“ der gesamten Stichprobe für die Prozentanteile der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen

T-Lymphozyten-Subpopulation	Effekt	df	F	p
CD4 <sup>+</sup> -Zellen	Medikamenteneffekt	1,000	0,705	n.s.
	Verlaufseffekt	2,403	1,398	n.s.
	Medikament X Verlauf	2,272	0,505	n.s.
CD8 <sup>+</sup> -Zellen	Medikamenteneffekt	1,000	0,019	n.s.
	Verlaufseffekt	2,725	0,796	n.s.
	Medikament X Verlauf	2,841	1,535	n.s.

Die Werte verlaufen unter den beiden Bedingungen „dex-Fenfluramin“ und „Placebo“ annähernd parallel (s. Abb. 34) und haben dabei ähnliche Baseline- und Endwerte. D.h., dass die Gabe von 15 mg dex-Fenfluramin und damit einhergehende Veränderungen im endokrinen und zentralnervösen Bereich keinen Einfluss auf die prozentuale Zusammensetzung der T-Lymphozytensubpopulation hat. Vielmehr dominiert hier der zirkadiane Rhythmus über eventuelle Medikamenteneffekte.

#### **4.6 Der Zusammenhang der Veränderungsmaße von PRL mit den Veränderungsmaßen der Leukozyten**

Um zu prüfen, ob die zellulären Verschiebungen durch Cortisol oder Prolaktin vermittelt sein könnten, liegt es zunächst nahe, der Frage nachzugehen, ob zwischen dem gemessenen Anstieg der PRL-Werte und den Zellveränderungen im Blut eine Verbindung bzw. Abhängigkeit besteht. Da bei Cortisol keine signifikanten Veränderungen auftraten, ist es unwahrscheinlich, dass die Zellzahlveränderungen über diesen Mechanismus mediiert wurden. Daher beschränkt sich die Zusammenhangsanalyse auf das Prolaktin.

Um zu überprüfen, ob die *Veränderungsmaße* der PRL-Serumspiegel mit den *Veränderungsmaßen* der Zellpopulationen im betrachteten Zeitraum korrelieren, wurde die Korrelation nach Pearson herangezogen.

Als „Veränderungsmaß“ wurde der Mittelwert aus den Messzeitpunkten B2-B4 (s. dazu auch Abb. 16) unter Verumbedingungen gebildet und der zugehörige Baselinwerte davon subtrahiert. Dasselbe erfolgte für die Placebobedingungen. Als Formel ausgedrückt ergibt sich der folgende Term für die Berechnung des Veränderungsmaßes:

$$\Delta V = \left( \frac{V2 + V3 + V4}{3} - V1 \right) \quad \text{und} \quad \Delta P = \left( \frac{P2 + P3 + P4}{3} - P1 \right)$$

$$\text{Medikamenteneffekt} = \Delta V - \Delta P$$

Es bedeuten:

- $\Delta V$ ,  $\Delta P$  = zu berechnender Term für das Veränderungsmaß unter Verum bzw. Placebo
- $V2$ ,  $V3$ ,  $V4$  = Werte unter Verumbedingungen zu den Messzeitpunkten 2, 3 und 4 (entsprechend 150, 210, 255 min)
- $P2$ ,  $P3$ ,  $P4$  = Werte unter Placebobedingungen zu den Messzeitpunkt 2, 3, 4 (entsprechend 150, 210, 255 min)

#### 4.6.1 Der Zusammenhang der Veränderung von PRL und der absoluten Anzahl der Leukozytenpopulationen

Wird dieses o.g. Veränderungsmaß für die Werte von PRL und für die Werte der absoluten Zellzahlen herangezogen, so erhält man das in Tab. 25 gezeigte Ergebnis:

**Tabelle 25:** Korrelation  $r$  nach Pearson zwischen den Veränderungsmaßen des PRL-Serumspiegels und den Veränderungsmaßen der absoluten Anzahlen der einzelnen Zellpopulationen.

Änderung absolute Zellzahlen				
Leukozyten	Neutrophile	Eosinophile	Basophile	Monozyten
-0,02	-0,13	+0,17	-0,06	+0,16

Änderung absolute Zellzahlen				
Lymphozyten	B-Zellen	T-Zellen	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
+0,28 <sup>(*)</sup>	+0,38 <sup>*</sup>	+0,21	+0,32 <sup>*</sup>	+0,18

(\*)  $p < 0,1$

\*  $p < 0,05$

Die Tabelle zeigt, dass die Veränderungsmaße von PRL in den wenigsten Fällen mit denen der Zellen signifikant korrelieren. D.h., dass die Veränderungen des PRL-Spiegels nur z. T. die Veränderung der absoluten Zellzahlen beeinflussen. Am ehesten gilt dies für CD4<sup>+</sup>- und B-Zellen (s.u.).

Dies zeigt, dass besonders die signifikant durch das Präparat angestiegenen Zahlen der eosinophilen Granulozyten und der Monozyten trotz eines gleichsinnigen Medikamenteneffekts auf Prolaktin *nicht* in dem vermuteten Zusammenhang mit der PRL-Serumspiegelerhöhung steht.

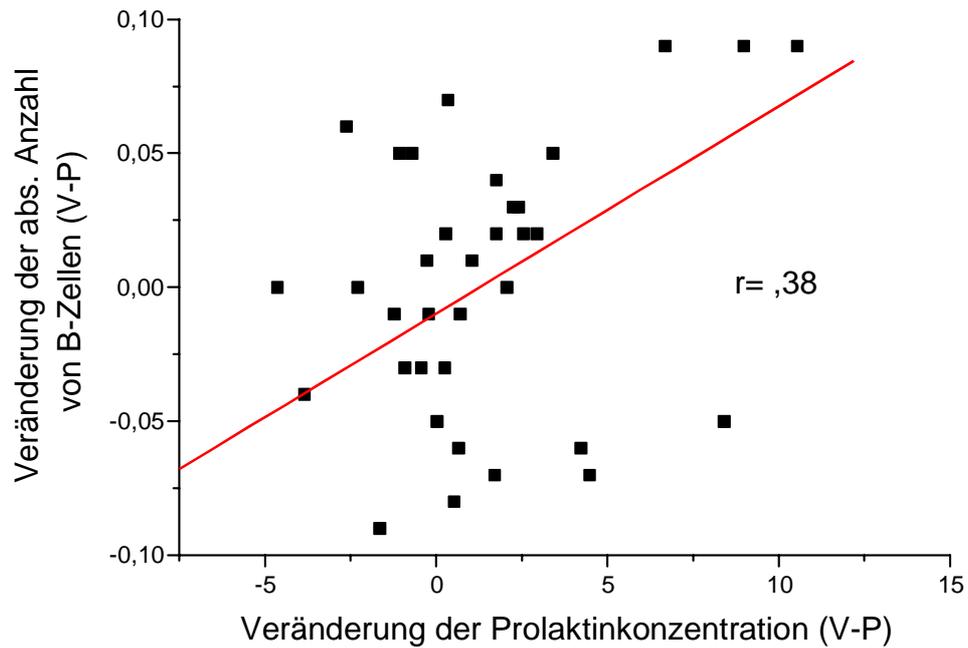
Ausnahmen hiervon bilden die Korrelation des PRL-Veränderungsmaßes mit denen der B-Lymphozyten und denen der CD4<sup>+</sup>-Zellen. Dabei ergeben sich jeweils positive Korrelationswerte, die auf dem statistischen Niveau von  $p < 0,05$  (zweiseitig) als signifikant angesehen werden können.

Ein positiver Trend ist in der Pearsonkorrelation zwischen Veränderungsmaßen des PRL und der gesamten Lymphozytenpopulation zu erkennen, es ist also ein schwacher möglicher Zusammenhang zu erkennen.

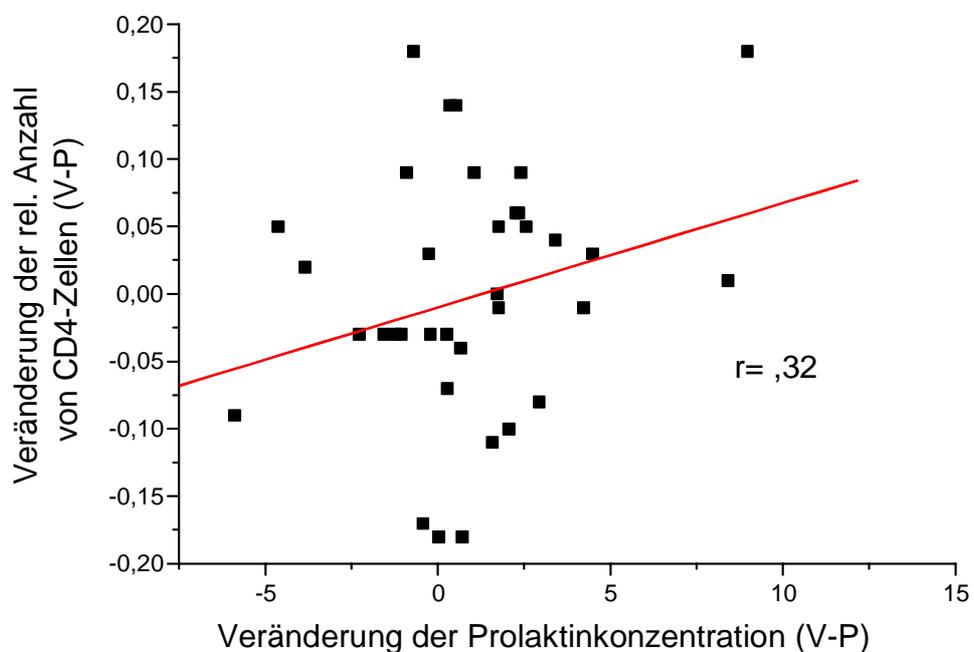
Obwohl kein signifikanter Medikamenteneffekt für B- und CD4<sup>+</sup>-Zellen in den Varianzanalysen nachgewiesen werden konnte, erreichen die Korrelationen der Veränderungsmasse der PRL-Werte mit den absoluten CD4<sup>+</sup>-Zellen und B-Zellen Signifikanz. Es sollen deshalb die Punktwolken dieser Korrelationen dargestellt werden. Für die Korrelation der Veränderung der PRL-Werte mit den Veränderungen der absoluten Anzahl der B-Zellen kann folgende Graphik aufgezeigt werden (s. dazu Abbildung 35 auf der folgenden Seite):

Wie deutlich zu sehen ist, kommt der Korrelationskoeffizient von +0,38 fast überwiegend durch drei Teilnehmer mit einer deutlichen PRL- und Zellveränderung zustande.

Für die absoluten Zahlen der CD4<sup>+</sup>-Zellen ergibt die folgende Abbildung 36 ein Scatterdiagramm mit ähnlicher Dimension (s. auch dazu Abb.36 auf der folgenden Seite):



**Abbildung 35:** Scattergramm der placebo-korrigierten Veränderung der Zahl der absoluten B-Zellen und der PRL-Veränderung unter dex-Fenfluramin.



**Abbildung 36:** Scattergramm der placebo-korrigierten Veränderung der Zahl der absoluten CD4<sup>+</sup>-Zellen und der PRL-Veränderung unter dex-Fenfluramin.

Auch hier kann man gut erkennen, dass die positive Korrelation mit dem Wert +0,32 fast ausschließlich auf einen Probanden mit einem hohen Ansprechen der CD4- und PRL-Werte zurückzuführen ist.

#### **4.6.2 Der Zusammenhang der Veränderung von PRL mit den Veränderungsmaße des prozentualen Anteils der Leukozytenpopulationen**

Zur Klärung der Frage, ob eine prozentuale Verschiebung der Zellen innerhalb der Leukozyten in Zusammenhang steht mit dem Anstieg in der PRL-Konzentration durch die serotonerge Stimulation, wird auch hier die Korrelation der Veränderungsmaße überprüft.

Für die Berechnung der Korrelation nach Pearson der Veränderungsmaße der prozentualen Anteile der Leukozytengruppen mit den Veränderungsmaßen des PRL-Spiegels im Serum werden folgende Werte erreicht (Tab. 26):

**Tabelle 26:** Korrelation  $r$  nach Pearson der placebokorrigierten Veränderungsmaße des PRL-Serumspiegels mit den entsprechenden Veränderungsmaßen der prozentualen Anteile der einzelnen Zellpopulationen

Änderung prozentualer Anteile				
Neutrophile	Eosinophile	Basophile	Monozyten	Lymphozyten
-0,02	+0,06	-0,01	+0,08	+0,09

Änderung prozentualer Anteile			
B-Zellen	T-Zellen	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
+0,32*	-0,25 <sup>(*)</sup>	+0,17	-0,18

(\*)  $p < 0,1$

\*  $p < 0,05$

Wie schon bei den absoluten Zellzahlen, sieht man auch hier nur sehr wenige signifikante Korrelationen zwischen den beiden Veränderungsmaßen, was wiederum auf deren Unabhängigkeit hinweist.

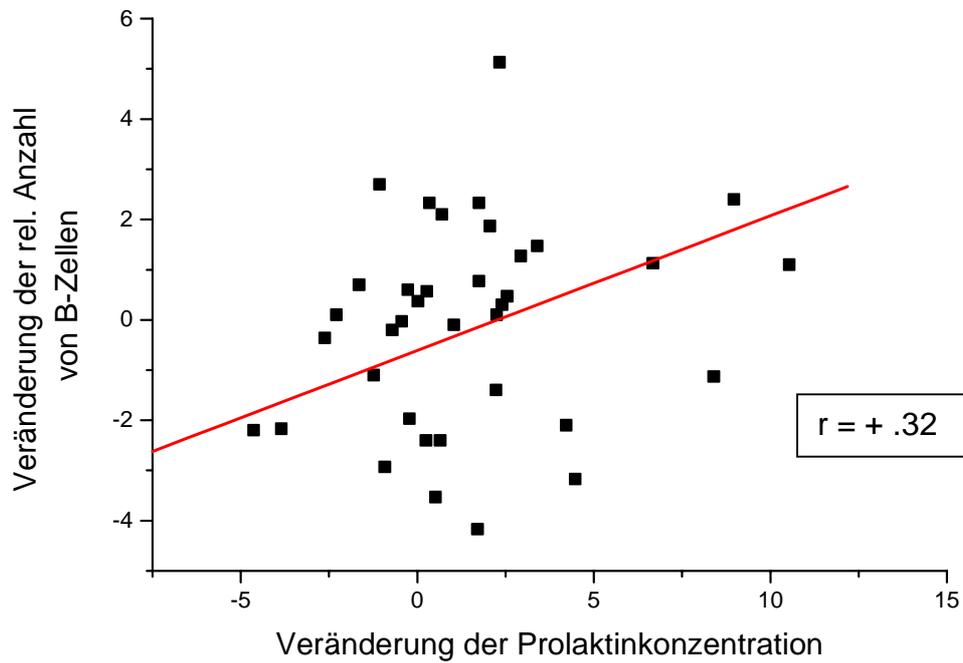
Lediglich bei den B-Lymphozyten kann eine signifikante Korrelation zwischen dem prozentualen Veränderungsausmaß der Zellen unter Placebo bzw. d-Fen und dem Veränderungsmaß von PRL festgestellt werden. Beide Variablen sind somit rechnerisch voneinander abhängig.

Die T-Zellen zeigen eine schwach negative Korrelation mit PRL.

Ausgehend von den Zellen, deren Anzahl sich unter der serotonergen Stimulation signifikant verändert hat, (absolute Zahl der Eosinophilen und Monozyten und prozentuale Werte der Monozyten, Lymphozyten und Eosinophilen), konnte bei keiner Zellpopulation eine signifikante Korrelation mit den Veränderungen der PRL-Werte gezeigt werden. Es handelt sich somit um voneinander unabhängige Veränderungen.

Der vermutete direkte Zusammenhang ist aufgrund der berechneten Pearson-Korrelation somit *nicht* gegeben. Die Zellzahlveränderung lässt sich damit nicht mit dem PRL-Anstieg begründen, es wurde damit gezeigt, dass in diesem Fall PRL nicht der auslösende Parameter der serotonerg induzierten Immunmodulation ist.

Die Korrelationen, die sich in der angegebenen Berechnung als signifikant herausstellten, insbesondere die zwischen prozentualer Zahl der B-Zellen und dem PRL-Wert sind, wie bereits im vorangegangenen Kapitel, auf einige „Ausreisser“ zurückzuführen. Siehe dazu auch die folgende Abbildung 37 auf der folgenden Seite:



**Abbildung 37:** Scattergramm der placebo-korrigierten Veränderung der relativen Anzahl von B-Zellen und der PRL-Veränderung unter dex-Fenfluramin.

Vernachlässigt man die einzelnen extrem hohen PRL-Werte, so wird die Korrelation wie leicht zu sehen ist, insignifikant.

## 5. Diskussion

### 5.1 Diskussion des dex-Fenfluramin induzierten PRL-Anstiegs

#### 5.1.1 Diskussion der mittels RIA gemessenen PRL-Werte

Zuerst einmal sollen die gemessenen PRL-Serumkonzentrationen ohne Stimulation kurz diskutiert werden, bevor der durch dex-Fenfluramin induzierte PRL-Anstieg besprochen wird.

Wie bereits im Kapitel 2.2.1 gezeigt, finden sich unterschiedliche Mittelwerte und Standardabweichungen sowie Referenzwerte für die PRL-Konzentration i.S. bei erwachsenen Männern in der Literatur. Bildet man in der von uns untersuchten Gruppe von 40 jungen erwachsenen Männern einen Mittelwert der PRL-Konzentrationen der fünf Messzeitpunkte, die unter Placebobedingungen fallen, so erhält man das folgende Ergebnis, das in Tab. 27 mit denen aus der Literatur verglichen wird:

**Tabelle 27:** Vergleich der Werte der PRL-Konzentrationen i.S. erwachsener Männer mit eigenen, unter Placebo bestimmten Werten. (k.A.= keine Angaben)

Referenz	Mittelwert $\pm$ Stdabw. bzw. Referenzbereich für PRL i.S. in [ng/ml]	Bestimmungsmethode
Kleinberger et al.(1977)	4,70 $\pm$ 2,82	k.A.
Sitzmann (1986)	5 $\pm$ 3 bzw. 5,2 $\pm$ 0,5	k.A.
Bruhn (1999)	< 16,0	LIA <sup>2)</sup>
Ammer et al. (1995)	0,68 – 10,68	RIA <sup>1)</sup>
Eigene Werte	8,52 $\pm$ 2,78	RIA

<sup>1)</sup> Radio-Immuno-Assay

<sup>2)</sup> Lumineszenz-Immuno-Assay

Vergleicht man diese Zahlen, so fällt auf, dass unsere gemessenen Werte zwar in den von Bruhn (1999) angegebenen Referenzbereich fallen und im oberen Bereich des von Ammer et al. (1995) angegebenen Referenzbereich für Normalwerte liegen. Sie liegen aber deutlich über den beiden anderen angegebenen Mittelwerten. Dieser Abweichung können mehrere Ursachen zu Grunde liegen. Zum einen die teilweise

unterschiedlichen Bestimmungsmethoden und Messverfahren, zum anderen in der tageszeitlichen Schwankungsbreite für PRL wie in Kap. 2.2.2.3 beschrieben. Demnach ist der Zeitpunkt der Blutentnahme ein wichtiger Faktor. Unsere Werte (gemessen als Durchschnittswerte in der Zeit von 14:00 – 18:30 Uhr) liegen danach in einem höheren Bereich, als dem zirkadianen PRL-Spiegel zu dieser Zeit entsprechen würde.

Die biologische Variabilität gilt nicht nur für die PRL-Werte, auch die immunologischen Parameter sind den zirkadianen und zirkaseptanen Rhythmen unterworfen. Gemäß den Forderungen von Knapp (1992), der der Berücksichtigung dieser Schwankungen bei Planung und Interpretation von Studien absolute Priorität beimisst, haben wir unser Versuchsdesign streng danach ausgerichtet (s. Kap. 3.4). Schließlich mag der von uns ermittelte leicht erhöhte PRL-Spiegel auch am ausgewählten „jungen“ Kollektiv liegen, da keiner der Probanden älter als 34 Jahre war und das durchschnittliche Alter bei 26,4 Jahren lag. Dies würde im Einklang mit den Befunden stehen, dass Kinder höhere Werten aufzeigen welche zur Pubertät hin abfallen. Diese Reduktion setzt sich somit auch noch nach der Pubertät fort und führt zu sinkenden Spiegeln mit dem Alter.

Letztendlich muss davon ausgegangen werden, dass die PRL-Werte bei Männern einer großen inter- und individuellen Schwankungsbreite unterworfen sind und die Grenze zu pathologischen Werten deshalb eher hoch angesetzt werden sollte.

### **5.1.2 Diskussion der serotonerg-induzierten Mechanismen der PRL-Freisetzung**

Bereits im theoretischen Teil der Arbeit wurde auf die Rolle von Prolaktin innerhalb des Immunsystems und seine „Releasing-Faktoren“ eingegangen. Einer dieser Faktoren, die eine Freisetzung von PRL bewirken können, ist der Neurotransmitter Serotonin. Inwiefern dafür ein direkter Mechanismus oder ein indirekter Mechanismus, z. B. via Dopamin, verantwortlich ist, wird in einem folgenden Kapitel noch diskutiert werden.

Zunächst einmal galt es, die Auswirkung einer eher geringen, einmaligen Dosierung von nur 15 mg dex-Fenfluramin (Isomeride®) an jungen, gesunden Probanden aufzuzeigen bzw. zu bestätigen, dass auch darunter eine signifikante PRL-Erhöhung möglich ist. Soweit aus der Literaturrecherche erkennbar wurde, ist diese geringe Dosierung bisher nur einmal in einer Studie, die einen PRL-Anstieg messen wollten, eingesetzt worden, jedoch nur in einer sehr viel kleiner Zahl an gemischt-geschlechtlichen Studienteilnehmern (s. Tabelle 28).

Da es sehr aufwendig wäre, den zentralen Anstieg von 5-HT bzw. die Zunahme seines Abbauproduktes 5-HIAA aus dem Liquor zu messen, wurde als abhängige Variable das hypophysäre Hormon Prolaktin gewählt, dessen mögliche Auswirkungen auf die Zellzahlveränderung von Leukozyten es zu untersuchen gilt.

Andere Studien, die ebenfalls dex-Fenfluramin als Stimulator des serotonergen Systems einsetzten, verwendeten in der Regel Dosierungen, die deutlich über 15mg lagen. Als Beispiele seien hier die folgenden Untersuchungen angeführt, die an gesunden Probanden vorgenommen wurden. Verwendet wurde dabei entweder das Racemat d-l-Fenfluramin oder das Isomer d-Fenfluramin in der jeweils angegebenen Dosierung (vergl. Tab. 28):

**Tabelle 28:** Überblick über einige serotonerge Provokationsstudien mit Fenfluramin (Fen) in unterschiedlichen Dosierungen. ↑ = Anstieg der Konzentration, (↑) = blunted response, m. = männliche, w. = weibliche Probanden, d-l-Fen = racemische Form

Studie von	Jahr	Fen-Dosis	Probanden-zahl	Endokrinologische Reaktion
O'Keane & Dinan	1991	30 mg d-Fen	16 (m.)	PRL↑, Cort.↑
Maes et al.	1991	45 mg d-Fen	10	PRL ↔, Cort. ↔
Hollander et al.	1992	60 mg Fen	10	PRL↑, Cort.↑
Goodwin et al.	1994	30 mg d-Fen	10 (m.)	PRL ↔, Cort. ↔
Yatham & Michalon	1995	60 mg d-l-Fen	10	PRL↑, Cort.↑
Bond et al.	1995	15 mg d-Fen	12 (m.+w.)	PRL↑, Cort. (↑)
Bond et al.	1995	30 mg d-Fen	12 (m.+w.)	PRL↑, Cort. ↑
Cleare et al.	1996	30 mg d-Fen	19	PRL↑, Cort.↑

Wie bereits in Kapitel 3.3 ausgeführt, entspricht die halbe Dosis d-Fenfluramin in etwa einer vollen Dosis von d-l-Fenfluramin in ihrer Wirkung. Man sieht an den Ergebnissen, dass in allen Studien mind. 30 mg d-Fen verwendet wurde (außer Bond et al., 1995) und es dadurch bei allen Studien, die einen Anstieg von PRL messen konnten, es auch zu einem Cortisolanstieg kam. Eine Dosis von 60 mg d-l-Fenfluramin (entsprechend 30 mg d-Fenfluramin) führte aber bei 90% der gesunden Probanden zu Nebenwirkungen wie Mundtrockenheit, Kopfschmerzen, leichte Benommenheit, Müdigkeit und Konzentrationsprobleme (Muldoon et al., 1996). Man sieht also, dass eine solche Dosis bereits Nebenwirkungen hervorrufen kann, diese wiederum als Stressoren wirken und damit eine Cortisolausschüttung bei den Probanden hervorgehoben werden können. Dieser Cortisolanstieg ist aber bei der Betrachtung der prolaktinvermittelten immunologischen Auswirkungen nur störend und sollte deswegen vermieden werden.

Unerwünschte Nebenwirkungen der Medikation (s. Kapitel 3.3) wurden von keinem der Probanden mitgeteilt. Unsere Ergebnisse bezüglich der endokrinologischen Antwort konnten somit die von Bond et al. (1995) erhaltenen Ergebnisse bei einer deutlich grösseren Anzahl von Studienteilnehmern bestätigen. Wir konnten mit der geringen Dosis von nur 15 mg dex-Fenfluramin unser Ziel einer serotonergen Stimulation mit PRL-Anstieg erreichen, ohne, dass dabei störende Nebenwirkungen auftraten. Diese würden einen Einfluss auf die von uns untersuchten endokrinologischen und immunologischen Parameter haben und so eine Interpretation der Ergebnisse erschweren. Damit entsprachen wir exakt dem von Yatham und Steiner (1993) geforderten Kriterium bei neuroendokrinen Studien: „5. Die Prüfsubstanz darf nicht zu stressigen Nebenwirkungen führen und sollte gut verträglich sein“ (Yatham und Steiner, 1993, p.448).

Der von uns gemessene maximale PRL-Wert lag bei 250 Minuten nach Einnahme des Pharmakons. Da es aber die letzte Messung im Rahmen der Untersuchung war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich der Anstieg weiter fortgesetzt hätte bzw. nach Erreichen des Peaks wieder zum Placebolevel abgefallen wäre. Zu vermuten ist jedoch, dass noch eine weitere Zunahme erwartet werden könnte, da dex-Fenfluramin auch erst nach 4 Stunden seinen höchsten Plasmaspiegel erreicht (Mc Tavisk, 1992) und dann auch seine maximale Wirkung und somit PRL-Freisetzung entfalten kann. Diese Frage, wie lange eine solche einmalige Stimulation Auswirkungen auf das endokrine und somit immunologische System hat, müsste in einer länger angelegten Studie überprüft werden.

Für weitere Studien, die das Aktivitätsniveau des serotonergen Systems mittels einer serotonergen Stimulation mit dex-Fenfluramin überprüfen wollen, sollte in Zukunft die Dosis von 15mg empfohlen werden, da sie einerseits die gewünschte serotonerge Stimulation ermöglicht und zugleich ohne störende „stressreiche Nebenwirkungen“ bleibt.

### **5.1.3 Diskussion eines direkten oder indirekten (=Dopamin vermittelten) PRL-Anstiegs**

Wie in Kapitel 2.2.2 ausführlich dargestellt, haben viele Stoffe einen Einfluss auf die Höhe der PRL-Konzentration im Organismus. Der wichtigste und potenteste unter ihnen dürfte Dopamin sein. Sein inhibierender Tonus auf die Ausschüttung von PRL aus dem HVL ist von entscheidender Bedeutung im Organismus. Die Frage ist nun in diesem Zusammenhang, ob eine serotonerge Stimulation auf direktem Wege zu einer PRL-Konzentrationssteigerung führt oder ob hier auch ein indirekter Mecha-

nismus durch eine Dopaminreduktion denkbar wäre. In Erwägung zu ziehen wäre auch ein kombinierter Mechanismus. Im Folgenden sollen nun einige Studienergebnisse bezüglich dieser Frage diskutiert werden. Jedoch wird ein Vergleich durch die Verwendung unterschiedlicher 5-HT-Agonisten, Dosierungen und Versuchsdesigns erschwert.

Um den serotonergen Einfluss auf eine PRL-Stimulation auszuschalten, werden häufig die unspezifischen 5-HT-Antagonisten Methysergid und Metergolin verwendet. Es hat sich aber gezeigt, dass beide Substanzen auch gewisse dopamin-agonistische Eigenschaften besitzen (Müller et al., 1983). So kann die Beobachtung von Coccaro et al. (1990), nämlich eine Unterdrückung der Buspiron-induzierten PRL-Sekretion durch Metergolin, auch dahingehend gedeutet werden, dass hier sowohl der 5-HT-Antagonismus, als auch der Dopamin-Agonismus in synergistischer Weise beteiligt waren.

Weiterhin ist bei anderen pharmakologischen Provokationsstudien die Dosis-Wirkungs-Beziehung nicht immer genügend berücksichtigt worden. So zeigten sich bei der Anwendung hoher Dosen teils widersprüchliche Ergebnisse. Die Verwendung hoher Dosen dex-Fenfluramins kann sich einerseits Dopamin-agonistisch auswirken (Müller et al., 1983), auf der anderen Seite haben Storlien & Smythe (1992) bei einer verabreichten Dosis von 2,5 mg/(kg x KG) d-Fen einen gegenteiligen Effekt festgestellt. Die hohe Dosierung, die in etwa dem Zwölffachen der in unserer Studie eingesetzten Menge entspricht, bewirkte in der Untersuchung der o.g. Autoren sowohl eine *Reduktion* der serotonergen Aktivität als auch eine *Steigerung* der Dopamin-Aktivität. Diese paradox klingende Wirkung ließe sich mit dem prä- und postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor erklären. Die sensibler reagierenden präsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub> – Autorezeptoren bewirken zu Beginn über ein negatives Feedback, eine starke serotonerge Hemmung, die größer ist als die Aktivierung der postsynaptischen Effekte (Göthert, 1990; Storlien & Smythe, 1992). Im Falle einer langandauernden d-Fen-Applikation kommt es im Laufe der Zeit zu einer Steigerung der serotonergen und dopaminergen Aktivität. Blier et al. (1993) führen diese Erscheinung ebenfalls auf die unterschiedlichen Qualitäten von prä- und postsynaptischen 5-HT-Rezeptoren zurück. So erfolgt nach einer längeren Behandlung mit verschiedenen 5-HT<sub>1A</sub> – Agonisten eine Desensibilisierung der präsynaptischen Autorezeptoren, wohingegen die postsynaptischen Rezeptoren keinerlei Aktivitätseinbußen in ihrer Sensitivität zeigten.

Einige Studien der letzten Jahre sprechen bezüglich der serotonergen PRL-Steuerung von einer Interaktion zwischen 5-HT und Dopamin. Beide Systeme weisen sowohl neuroanatomische wie auch physiologische Verbindungen auf, die eine Interaktion möglich machen könnten. Dabei stellt sich auch die Frage, welche 5-HT-Rezeptoren an den Steuermechanismen beteiligt sind.

Ausläufer serotonerger Neurone ziehen in Bereiche des Hypothalamus, wo sie synaptische Verbindungen mit dopaminergen Neuronen eingehen (Page, 1992). Damit in Zusammenhang könnte die folgende Beobachtung stehen: Eine Blockade des 5-HT-Systems verhindert den sonst physiologischen Prolaktinanstieg beim Stillen (Page, 1992).

In mehreren Arealen des ZNS (Ncl. accumbens, Striatum) konnten 5-HT-Rezeptoren an dopaminergen Nervenzellen nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden (Göthert, 1990), dass es sich dabei um inhibierende, aber auch aktivierende, also Dopamin freisetzende Rezeptoren (5-HT<sub>3</sub> –Heterorezeptoren) handelt. So ließe sich die von Van de Kar et al. (1996) beschriebene PRL-Spiegelerhöhung durch Aktivierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren mit der Hemmung des dopaminergen Systems erklären.

Über das Zusammenwirken des serotonergen und dopaminergen Systems berichten auch ausführlich Kelland & Chiodo (1996): In elektrophysiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine elektrische Stimulation im Ncl. raphe dorsalis zu einer Hemmung des dopaminergen Systems im Mesoaccumbens führt. Ebenso kann die dopaminerge Aktivität durch hohe Dosen eines 5-HT<sub>1A</sub>-Antagonisten, der direkt am Neuron appliziert wird, gehemmt werden.

Kelland und Chiodo gehen zusammenfassend davon aus, dass 5-HT-Agonisten die Dopaminfreisetzung erleichtern durch Vermittlung über 5-HT<sub>1</sub> -, 5-HT<sub>2A</sub> - und 5-HT<sub>3</sub> - Rezeptoren.

Die Komplexität dieser Materie zeigt sich durch scheinbar immer wieder auftretende Widersprüche in den Ergebnissen verschiedener Studien. Im Gegensatz zur eben beschriebenen verstärkten Dopaminfreisetzung durch 5-HT-Agonisten zeigten Pilotte & Porter (1981, zit. n. Melzer et al.) eine signifikante Reduktion der Dopaminkonzentration im Hypophysenstiel nach einer 5-HT-i.c.v.-Applikation und daraus resultierendem PRL-Anstieg.

Neben den eben angeführten Mechanismen werden auch noch andere Mediatorenwege diskutiert. Wie in Kap. 2.2.2 dargestellt wurde, zeigen viele potentielle Faktoren einen Einfluss auf das Peptidhormon Prolaktin, so dass weitere Mechanismen denkbar sind. Einer davon ist beispielsweise die Regulation mittels Opioiden. Hinweise darauf geben Untersuchungen (Yatham & Steiner, 1993), die einen verminderten PRL-Anstieg nach Vorbehandlung mit dem Opiatantagonisten Naloxon zeigen. Dies würde für eine mögliche Beteiligung des Opioid-Systems sprechen (s. dazu auch Kap. 5.7).

Eine alleinige direkte PRL-Antwort aufgrund serotonerger Stimulation ist wegen der oben dargestellten Sachverhalte zwar denkbar, jedoch würde sie den Hinweisen auf eine dopaminerge Beteiligung nicht gerecht werden. Man sollte deshalb davon ausgehen, dass hier eine Interaktion des serotonergen und des dopaminergen Systems vorliegt, wobei die Frage nach dem exakten Mechanismus noch nicht als beantwortet gelten kann.

## 5.2 Diskussion der dex-Fenfluramin induzierten Cortisolveränderungen

Cortisol und andere Glucocortikoide gehören zum festen Bestandteil des endokrinen-immunologischen Zusammenspiels, was in der Literatur weitreichend beschrieben ist. Sie sind die natürlichen Regulatoren im Rahmen einer Immunreaktion, die überschießende Reaktionen unterdrücken können, u.a. durch die Hemmung der proinflammatorischen Zytokinsynthese. Die hohe Potenz, mit der Cortisol in die Regulation des IS eingreifen kann, ist in der Medizin so etabliert, dass es aus dem klinischen Alltag nicht mehr wegzudenken ist. Die Kortikosteroidwirkungen auf das Immunsystem lassen sich in eine anti-inflammatorische und eine immunsuppressive Wirkung aufteilen. Die Einflussnahme erfolgt dabei über eine direkte Geneinwirkung des Steroids auf zytoplasmatische Rezeptoren in der Immunzelle und hat u.a. die in Tab. 29 genannten Wirkungen zur Folge:

**Tabelle 29:** Cortikosteroidwirkungen auf das Immunsystem, untergliedert in anti-inflammatorische und immunsuppressive Wirkung. Zusammengestellt nach Peter, 1996 und Janeway & Travers, 1997. (↓= Hemmung, Verminderung; ↑= Induktion)

Anti-inflammatorische Wirkungen	Immunsuppressive Wirkungen
Kapillarpermeabilität ↓	Lympho- und Monozytopenie durch Umverteilung Blut → Gewebe ↑
Leukozytenadhärenz am Endothel ↓	CD4/CD8-Verhältnis ↓ (stärkere Abnahme von CD4 als von CD8)
Leukozytenchemotaxis ↓	B-Zellen ↓
Leukozytenmigration ↓	T-Zell-Proliferation auf Antigene, Mitogene und Alloantigene ↓
IL-1-Produktion d. Makrophagen ↓	IL-2- u. IFN- $\gamma$ -Produktion d. T-Zellen ↓
Arachidonsäuremetabolismus ↓	Apoptose v. Lymphozyten u. eosinophilen Granulozyten ↑

Somit ist es von entscheidender Bedeutung, dass bei Studien, die sich der Interaktion von endokrinem und immunologischen System widmen, die Einflüsse des Cortisols nicht übersehen werden dürfen. Wie bereits im Kapitel 3.5.3 dargestellt, bietet das nicht-invasive Verfahren der Speichelcortisolmessung eine gute und etablierte Möglichkeit, die Cortisolspiegel von Probanden relativ einfach zu messen.

Die hohen Ausgangswerte zu Beginn der Untersuchung (s. Abb. 20) sind zum einen auf den zirkadianen Rhythmus zurückzuführen. Dabei liegt das Maximum der Cortisolkonzentration in den frühen Morgenstunden, das Minimum vor dem Einschlafen (Peter, 1996). So liegen in dieser Versuchsanordnung die höchsten Werte gemäß der zirkadianen Cortisolfreisetzung am frühen Nachmittag und fallen zum frühen Abend hin ab. Diese Tendenz zeigt sich sowohl in der Placebo als auch in der Verumgruppe.

Zum anderen liegt eine Ursache der hohen Cortisolwerte zu Beginn des Versuchs vermutlich in seiner Eigenschaft als Stresshormon. Die neue Situation und Umgebung sowie der zeitlich enge Zusammenhang mit der Venenpunktion beim Legen der Verweilkanüle in den Unterarm sind Stressoren, die als Auslöser für die erhöhten Cortisolwerte gezählt werden können. Nach Roitt (1988) kann Stress zu einem Anstieg des Corticoidspiegels um das 10-15-fache führen. Danach gewöhnt sich der Proband an die Situation, und die Verweilkanüle im Unterarm rückt gedanklich in den „Hintergrund“, da sie durch einen Verband nicht mehr direkt sichtbar ist. Es kommt dann, wie erwartet, auch zum Abfall der Cortisolwerte während beider Versuchsbedingungen. Jedoch bleiben die Werte ab dem Zeitpunkt 150 Minuten in etwa auf dem gleichen Niveau und zeigen keinen weiteren Abfall. Dies ist vermutlich mit der trotz Adaptation noch vorhandenen weiteren leichten Anspannung der Probanden unter den Versuchsbedingungen zu erklären.

Aufgrund der nicht signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Medikamenten- versus Placebowirkung auf den Cortisolspiegel kann man davon ausgehen, dass sich die Cortisolwerte in beiden Gruppen nicht unterscheiden. Dies führt zu den gleichen potentiellen Cortisoleinflüssen für beide Gruppen. Diese Größe stellt somit keinen störenden Einfluss bei der Betrachtung der Veränderungsmaße der serotonerg induzierten Immunzellmigration dar. D.h., bei der weiteren Betrachtung der Effekte von dex-Fenfluramin auf Immunzellen unterliegen Placebo und Verumgruppe den gleichen Voraussetzungen, und dieser Faktor braucht nicht weiter berücksichtigt zu werden.

### **5.3 Vergleich der Ansprechrate von PRL und Cortisol auf eine serotonerge Stimulation durch dex-Fenfluramin**

Ein weiterer Aspekt lässt sich aus dem ausbleibenden Cortisolresponse gegenüber dem hochsignifikanten PRL-Response noch diskutieren: Hohe Dosen dex-Fenfluramin zeigten in fast allen Studien (s. Kap. 5.1.2) ein Ansprechen beider Hormone – Prolaktin und Cortisol - auf die serotonerge Stimulation. Wird nun die Dosis (und damit die Stimulation des 5-HT-Systems) soweit gesenkt, dass man in einen Bereich kommt, in dem ein Ansprechen grenzwertig ausbleibt, lässt sich erkennen, welches der beiden Hormonsysteme das sensitivere bezüglich serotonerger Aktivierung ist. In diesem Fall trifft das auf die hypophysäre PRL-Freisetzung zu, die noch erfolgt, während der serotonerge Stimulus für eine Cortisolerhöhung nicht mehr ausreicht. Dies zeigt, dass sich unterschiedliche serotonerge Aktivierungszustände, wie sie beispielsweise im Zusammenhang mit Depression, impulsivem Verhalten oder Autoaggression stehen (Benkert, 1993; Hennig, 1996; Levy, 1992; Coccaro, 1996), primär auf das PRL-System auswirken, und erst in zweiter Linie das HHN-System betroffen ist. Aufgrund der These der antagonistischen Effekte auf das Immunsystem von PRL und Cortisol (s. Kap. 2.3.1.2), könnte so einer immunologischen Modulation durch Cortisol mit einer zuvor eingeleiteten PRL-Veränderung begegnet werden.

### **5.4 Diskussion methodischer Aspekte**

Die hohen Konzentrationen von Cortisol und PRL zu Beginn unserer Messungen sind auf externe Einflussfaktoren im Rahmen der Versuchsdurchführung und nicht auf den zirkadianen Rhythmus zurückzuführen. Zu diesen externen Störgrößen zählen die oben erwähnte Stressreaktion auf die Punktion mit der Verweilkanüle, aber auch die zuvor als Mittagessen eingenommene Mahlzeit. Wie bereits in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben, kann eine proteinreiche Mahlzeit einen PRL-Anstieg zur Folge haben. Insbesondere sind vor allem Cortisolanstiege durch Nahrungsaufnahme bekannt. Auch die körperliche Aktivität direkt vor der Untersuchung beeinflusst endokrine Parameter. Es wäre deshalb im Rahmen einer weiteren Standardisierung der Versuchsbedingungen bei folgenden Provokationsstudien wünschenswert, dem zu begegnen. Die Probanden sollten früher einbestellt werden und erhalten dann bereits in den Versuchsräumen ein (proteinarmes/ tryptophanarmes) Mittagessen. Zwischen dem Essen und dem Beginn der Studie kann dann ein Zeitraum durch Lesen o.ä. überbrückt werden, ohne dass die Probanden sich erneut einer größeren körperlichen Anstrengung aussetzen können.

Mit solchen Maßnahmen ließe sich zwar eine Standardisierung verbessern, jedoch hätten sie wenig Einfluss auf die während der Untersuchung stattfindenden Stressoren (lange Fragebögen ausfüllen, Reaktionszeitaufgaben, Langeweile etc.), die je nach Proband sehr unterschiedlich empfunden werden können. Diesem Problem sind wir, im Vergleich zu anderen Provokationsstudien, durch die sehr hohe Zahl an Versuchspersonen begegnet, was zwar einen höheren Aufwand bedeutet, die Ergebnisse dafür aber auf eine solide Basis stellt.

Die Entscheidung für die niedrige Dosis von nur 15 mg d-Fen wurde bereits im vorhergehenden Abschnitt erläutert. Es sollte hier noch ergänzend hinzugefügt werden, dass ein weiterer Grund für die geringe Dosis die Trennung von Responder- und Nonrespondertypen war, die in den auf dieser Studie basierenden Diplomarbeiten unter dem Aspekt wichtig waren, dass Respondertypen im Kontext mit unterschiedlichen Persönlichkeitsmerkmalen im Rahmen der differentiellen Psychologie ausgewertet wurden.

Ein Problem könnte die verabreichte Absolutdosis an alle Probanden darstellen, denn damit kommt es zu Schwankungen in der relativen Dosis, die sich auf das Körpergewicht (KG) der einzelnen Versuchsteilnehmer bezieht. Es wurde zwar das KG der Probanden ermittelt, jedoch nicht die Dosis entsprechend einer Relativedosis angepasst.

Es wurde deshalb überprüft, ob sich das unterschiedliche Gewicht auf die endokrine Reaktion auswirkte, indem die Korrelation zwischen Körpergewicht (KG) und Prolaktin- bzw. Cortisolresponse berechnet wurde. Wie sich herausstellte, lag keine signifikante Korrelation zwischen dem KG und dem Cortisol- und PRL-Response vor. Die errechneten Werte lagen für Cortisol bei  $r=0,22$  ( $p=0,19$ ), und für PRL bei  $r=0,29$  ( $p=0,08$ ). Allenfalls für PRL ist ein Trend bezüglich KG und PRL-Response auszumachen, der aber eher darauf hinweist, dass bei höherem Gewicht und damit relativ gesehen, geringeren proportionalen Dosen eine höhere PRL-Antwort erfolgt, was auf andere Beziehungen zwischen Gewicht und PRL hinweist als sie durch die standardisierte Dosierung gegeben wären.

Zukünftige Studien sollten deshalb körperrgewichtsadaptierte Dosen an dex-Fenfluramin einsetzen, um Auswirkungen serotonerger Stimulationen noch exakter bestimmen zu können.

## **5.5 Diskussion der dex-Fenfluramin induzierten Zellzahlveränderung an peripheren Leukozyten**

Ein komplettes Verständnis (sofern dies jemals der Fall sein sollte) der Interaktionen zwischen ZNS, ES und IS baut nicht nur auf dem Wissen der detaillierten, intrazellulären Funktionsabläufe der einzelnen Immunzelle gegenüber den anderen Komponenten auf, sondern ebenso auf dem Wissen um die Populationskinetiken und Turnover-Raten der Leukozyten in der Peripherie.

Zu den wichtigen zentralen Neurotransmittersystemen gehört das in weite Bereiche des ZNS ziehende serotonerge System. Seine Funktionen wurden ausführlich im Kapitel 2.1.4 beschrieben. Ziel unserer Studie war es nun, den Einfluss einer zentralnervösen serotonergen Stimulation mittels dex-Fenfluramin auf das periphere Immunsystem zu untersuchen und dabei die Rolle von PRL als möglichem Vermittler zwischen ZNS und IS zu überprüfen.

Betrachtet man nun die einzelnen Zellfraktionen, ist zu bemerken, dass alle von uns gemessenen Werte für die Anzahlen der Leukozyten bzw. der Subpopulationen in den allgemein üblichen Referenzbereichen für eine Normalpopulation liegen. Dies gilt zum einen für die Baseline- und Placebowerte als auch für die Werte, die unter Stimulationsbedingungen erreicht wurden. Die Grenze zum Pathologischen wurde weder in der absoluten Zellzahlbetrachtung noch in den prozentualen Angaben über bzw. unterschritten.

Unsere Betrachtungen der Zellzahlveränderungen und Änderungen der endokrinen Parameter bewegen sich somit im Normalbereich gesunder Menschen und können so als Veränderungen gesehen werden, wie sie im Organismus unter physiologischen Umständen vorkommen und nicht durch pathologische oder medikamenteninduzierte Dosen erreicht werden. Dies bietet die Möglichkeit, Aussagen zu treffen, die aus den im physiologischen Bereich beobachtbaren oder erschließbaren Interaktionen von ZNS, ES und IS auf den pathologischen Bereich übertragen werden können.

Im Folgenden sollen die Zellveränderungen anhand der verschiedenen Zellgruppen im Einzelnen diskutiert werden:

### **5.5.1 Diskussion der Auswirkung der d-Fen-Stimulation auf die Granulozyten**

In der Gruppe der granulozytären Zellen kann unter der zentralen serotonergen Stimulation mit dex-Fenfluramin ein Anstieg der mittleren Zellzahlen beobachtet werden. Bei den eosinophilen Zellen erreicht diese Zunahme statistisch signifikante Werte. Diese Zunahme ist einerseits in den absoluten Zellzahlen zu verzeichnen aber auch im prozentualen Anteil ist noch ein schwach signifikanter Anstieg unter Verum zu verzeichnen.

Die ebenfalls bei Eosinophilen ansteigenden Zellzahlen unter Placebobedingungen deuten auf zirkadian bedingte Ursachen hin (Knapp, 1992). Da unser Untersuchungszeitraum im Bereich der fallenden Cortisolspiegel liegt, deckt sich dies mit den Befunden, dass die Cortisolkonzentration und Zahl der eosinophilen Granulozyten negativ miteinander korrelieren (Wardlaw, 1994, Levenson, 1996).

Die Zahl der Neutrophilen unter Placebo zeigt zuerst einen kurzen Anstieg, dann kommt es zu einer Stagnation bzw. zum Absinken der Werte. Dies lässt sich mit der positiven Korrelation von Cortisol und der Neutrophilenzahl (Karow, 1995) vereinbaren.

Die signifikant stärkere Zunahme der Eosinophilen unter dex-Fenfluramin vs. Placebo wird insbesondere im Zeitintervall 210-255 Minuten nach Medikamenteneinnahme deutlich. Im gleichen Bereich ist unter Placebobedingungen sogar ein leichter Abfall der Mittelwerte zu verzeichnen. Der dex-Fenfluramin-Einfluss zeigt so den Wirkungsbeginn ca. 4 Stunden nach der Einnahme. Dies entspricht dem Zeitraum, in dem die höchsten Plasmakonzentrationen des Pharmakons in der Pharmakokinetik (Mc Tavisk, 1992) erreicht werden. Geht man von der zentralen Wirkung auf das serotonerge System aus, ist es jedoch erforderlich, dass das Präparat die Blut-Hirn-Schranke passiert, was mit einer Zeitverzögerung geschieht. Deshalb ist mit den höchsten im ZNS bestimmten d-Fen-Spiegeln in der Zeit > 4 Stunden zu rechnen. Es wäre deshalb wichtig, die weiteren Veränderungen nach dem Zeitpunkt 255 Minuten zu verifizieren, um einen unter diesen Umständen vermuteten weiteren Anstieg noch deutlicher aufzuzeigen.

Der von uns beobachtete Zellanstieg der Eosinophilen deckt sich mit den im *New England Journal of Medicine* veröffentlichten Beobachtungen einer Arbeitsgruppe (Silver, Heyes, Maize et al., 1990), die bei einigen hauterkrankten Patienten einen Zusammenhang zwischen der Einnahme von Tryptophan und einer Eosinophilie beobachtete, ohne dass eine Erklärung dafür gefunden wurde. Einige dieser Patienten nahmen zusätzlich Benzodiazepine ein. Tryptophan als Vorstufe von Serotonin (s. Kap. 2.1.1) wurde dabei in einer Dosis von 1,5-3,0 g pro Tag verabreicht mit teils

unterschiedlichen Behandlungsintentionen (Fettleibigkeit, Depression, etc.). Dieser Stimulation des 5-HT-Systems liegt keine selektive Stimulation von 5-HT-Rezeptoren zu Grunde, vielmehr wird eine unspezifische Stimulation erreicht. Man kann davon ausgehen, dass die beobachteten hohen Eosinophilenzahlen zum einen durch eine supprimierte HHN-Achse (wegen einer gleichzeitigen Einnahme von Benzodiazepinen) und zum anderen durch die tryptophaninduzierte serotonerge Stimulation, wie wir sie durch die Gabe von dex-Fenfluramin als Reuptakeinhibitor bzw. Releaser erreicht haben. Es kann also auch davon ausgegangen werden, dass sich eine allgemeine serotonerge Stimulation auf die Anzahl der zirkulierenden Eosinophilen auswirkt.

Der beobachtete reduzierte prozentuale Anteil der Neutrophilen an den Gesamtleukozyten trotz steigender absoluter Werte, ist auf den gleichzeitig noch stärker ausgeprägten Anstieg der Lymphozyten und Monozytengruppe zurückzuführen, so dass die Population der Neutrophilen relativ dazu sinkt.

Der dex-Fenfluramin bedingte Anstieg der Eosinophilen und die damit verbundenen möglichen Mechanismen werden im Kap.5.7 in Zusammenschau mit den anderen Zellen diskutiert.

Eine signifikante Veränderung der basophilen Granulozyten trat konform der formulierten Hypothese nicht auf. Die Zunahmen im Verlauf der Untersuchung verlaufen zunächst ähnlich. Ab dem o.g. Wirkeintritt erkennt man einen stärkeren Anstieg der Zellen in der Placebogruppe als unter Verumbedingungen, allerdings erreichen die Unterschiede keine signifikanten Werte.

### **5.5.2 Diskussion der Auswirkung der d-Fen-Stimulation auf die Monozyten**

Wie bei den Granulozyten ist auch bei den Monozyten in beiden Bedingungen ein Anstieg der Zellzahlen festzustellen. Jedoch übertrifft der Zuwachs unter dex-Fenfluramin von ca. 15% den ca. 5-prozentigen Anstieg, wie er unter Placebo auftritt, deutlich.

Der leichte Zuwachs unter Placebo ist wiederum ein Effekt der zirkadianen Rhythmik im Organismus (Knapp, 1992), der u.a. mit den tendenziell sinkenden Cortisolspiegeln im Beobachtungszeitraum zu vereinbaren ist (Peter, 1996; Janeway & Travers, 1997).

Auch hier ist ein Zusammenhang mit beginnender maximaler Wirkung von dex-Fenfluramin und der größten Veränderung in der Anzahl der Zellen zu erkennen.

Während im Bereich 210-255 Minuten nach Medikamenteneinnahme ein starker Anstieg unter der Verumapplikation zu sehen ist, kommt es bei der Placebogruppe zu einem Absinken der Werte. Wie bereits dargestellt, fällt dieser Zeitraum in den Bereich der maximalen Plasmakonzentration von dex-Fenfluramin nach Einnahme. Falls die Reaktion der Zellveränderung, wie anzunehmen ist, mit einer zeitlichen Verzögerung eintritt, wären weitere Messzeitpunkte von Bedeutung, um Aussagen machen zu können, wie lange dieser unter dex-Fenfluramin hervorgerufene Effekt der Steigerung der zirkulierenden Monozyten anhält.

Der prozentuale Anteil an der gesamten Population der Monozyten sinkt während des Beobachtungszeitraumes in beiden Gruppen. Ursache sind die überproportional stärker ansteigenden Lymphozytenzahlen, die durch ihre größere prozentuale Gewichtung diese Verschiebung ermöglichen. Allerdings wird ein signifikant stärkeres Absinken in der Placebogruppe vs. d-Fen-Gruppe deutlich. Die serotonerge Stimulation wirkt also der zirkadianen Abnahme der Monozyten in den Nachmittagsstunden entgegen.

Interessant ist eine Beobachtung von Kho et al. (1990), die in einer operativ bedingten Stresssituation mit erhöhten Cortisolwerten keine Änderung der Anzahl der Monozyten zeigen konnte. Die Ursache liegt dabei möglicherweise in den gleichzeitig angestiegenen Werten der Katecholamine und des PRL-Spiegels. Die „antagonistischen“ Eigenschaften von PRL gegenüber den Kortikosteroiden (s. Kap. 2.3.1.2) ist eine mögliche Erklärung für die nicht aufgetretenen Veränderung der Monozyten.

### **5.5.3 Diskussion der Auswirkung der dex-Fenfluramin-Stimulation auf die Lymphozyten**

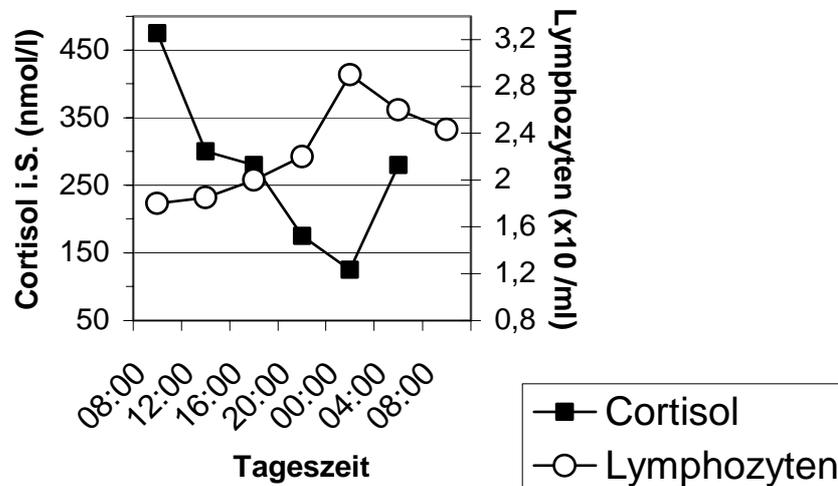
Wie im Ergebnisteil zu sehen ist (Abb. 26), kommt es sowohl in der Placebogruppe als auch in der Verumgruppe zu einem ca. 20-prozentigen Anstieg der absoluten Lymphozytenzahlen. Es resultiert aber kein signifikanter Gruppenunterschied.

Betrachtet man allerdings die prozentuale Zusammensetzung der Leukozytenpopulation, so ergibt sich eine Tendenz hin zu einem stärkeren Anstieg des prozentualen Anteils der Lymphozyten unter Verum. Serotonerge Einflüsse auf die Lymphozyten machen sich also nicht in einer absoluten Zahlenveränderung bemerkbar, sondern in der Zusammensetzung der Leukozyten bezüglich des Lymphozytenanteils.

Diese Entwicklung zeigte sich bei den bereits besprochenen Zellen, da diese in ihrem Anteil eine abnehmende Tendenz aufwiesen.

Die natürliche Schwankung der Lymphozyten unterliegt, wie die anderen Zellen, auch der zirkadianen Rhythmik (Knapp, 1992), die z.T. in Zusammenhang mit den zirkadianen Cortisolrhythmen stehen. Stellvertretend für eine ganze Reihe von Zellen

seien hier exemplarisch die tageszeitlichen Schwankungen der Lymphozyten im Vergleich zur Cortisolrhythmik dargestellt (Abb.38).



**Abbildung 38:** Zirkadianer Rhythmus der Cortisolkonzentration i.S. und der Gesamtzahl der im Blut zirkulierenden Lymphozyten (modifiziert nach Haus, 1994, p.514)

Wie aus der Abbildung ersichtlich, stimmen die von uns ermittelten Werte für Cortisol und für die Gesamtzahl der Lymphozyten in ihrem zirkadianen Verlauf mit den dargestellten Tendenzen überein, obwohl ja die fehlende Korrelation der Änderungsmaße nicht auf einen kausalen Mechanismus hinweist.

Aussagekräftiger als die Zahl der gesamten Lymphozyten ist die separate Betrachtung des serotonergen Einflusses auf die Untergruppen, wie sie in den folgenden Kapiteln erfolgt:

#### **5.5.4 Diskussion der Auswirkung der dex-Fenfluramin-Stimulation auf die B-Lymphozyten**

In Einklang mit der gesamten Lymphozytenzahl zeigen auch die B-Zellen keinen signifikanten Gruppenunterschied. Betrachtet man allerdings den Zeitraum, in dem die maximalen dex-Fenfluramin-Plasmaspiegel erreicht werden, so sieht man einen deutlich stärkeren Anstieg der B-Zellzahlen in der Verumgruppe. Auch bei der prozentualen Betrachtung zeigt sich diese Tendenz. Ab dem Zeitpunkt 210 min fällt der Anteil unter Placebo ab, unter Verum nimmt der Anteil der B-Zellen an den Lymphozyten zu. Ob sich dieser Anstieg im Verlauf fortsetzen und signifikante Unterschiede

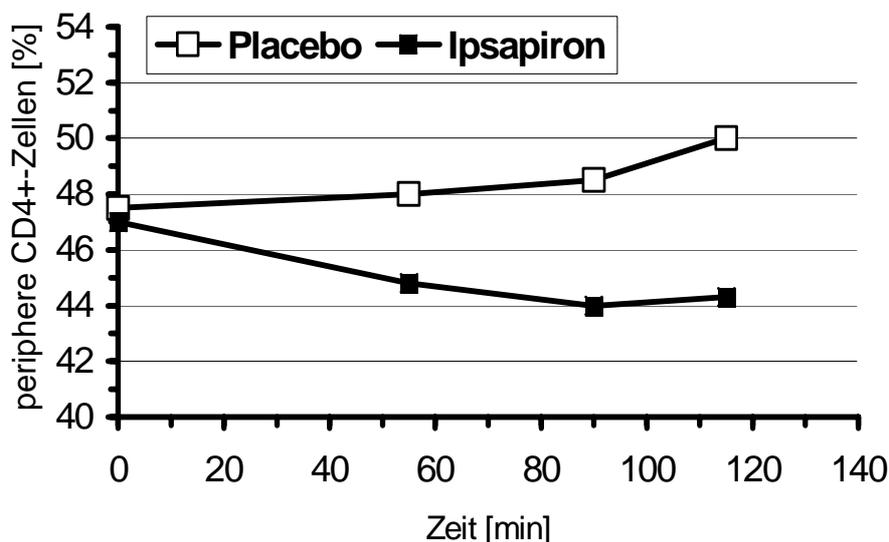
erreichen könnte, müsste in einem längeren Beobachtungszeitraum überprüft werden.

In einer Studie mit dem 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten Ipsapiron (10 mg) (Hennig et al., 1996) resultierte ebenfalls kein signifikanter Anstieg der B-Lymphozyten in der Zirkulation. D.h. also, dass weder eine spezifische 5-HT<sub>1A</sub>-Stimulation noch eine generelle Stimulation des serotonergen Systems mit dex-Fenfluramin mit B-Zellzahlveränderungen einhergehen. Es muss jedoch ergänzend hinzugefügt werden, dass die Studie von Hennig et al. mit einem Cortisolanstieg einherging, weshalb die Resultate der serotonergen Stimulationen nur bedingt vergleichbar sind.

Auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit, dass B-Zellen grundsätzlich erst später und auf stärkere Stimulationen des serotonergen Systems reagieren können. Dies würde die Ergebnisse von Hennig et al., die einen noch kürzeren Beobachtungszeitraum wählten und unsere Ergebnisse erklären.

### **5.5.5 Diskussion der Auswirkung der dex-Fenfluramin-Stimulation auf die T-Lymphozyten, die CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen**

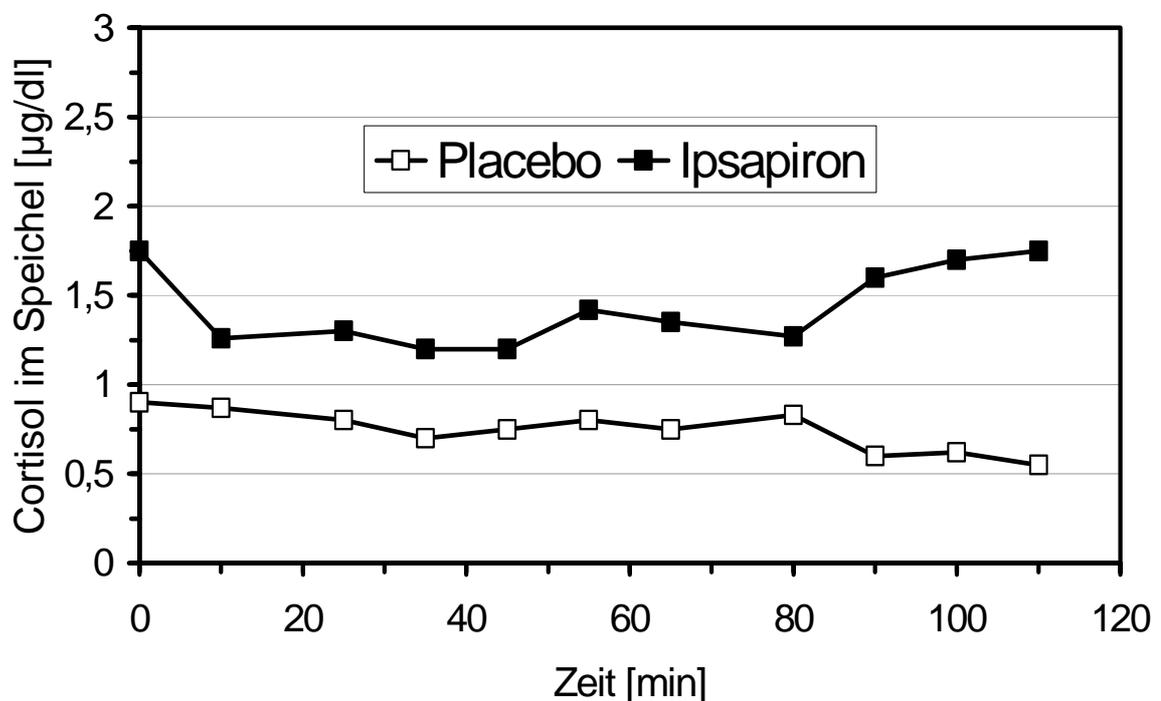
Hennig et al. (1996) untersuchten in einer Studie das Zusammenspiel zwischen dem serotonergen Systems und dem Migrationsverhalten peripherer Leukozyten am Beispiel der CD4<sup>+</sup>-Zellen.



**Abbildung 39:** Prozentualer Anteil an CD4<sup>+</sup>-Zellen im Blut nach Einnahme des 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten Ipsapiron bzw. Placebo (Hennig et al., 1996)

Sie verwendeten zur Stimulation des 5-HT-Systems den selektiven 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten Ipsapiron (10 mg) in einer einmaligen Dosierung. Bei den Probanden handelte es sich ebenfalls um 40 junge gesunde Männer, die je zur Hälfte Verum bzw. Placebo erhielten. Dabei zeigte sich ein hochsignifikanter *Abfall* der Zahl der peripheren CD4<sup>+</sup>-Zellen ( $p < 0,01$ ). Andere untersuchte Zellen, wie die CD8<sup>+</sup>-Zellen, wiesen keine signifikanten Änderungen bezüglich der Gruppenzugehörigkeit auf (vergl. Abb. 39).

Die gleichzeitig untersuchten Speichelproben auf Cortisol ergaben einen signifikanten Anstieg in der Ipsapiron-Gruppe. Siehe dazu auch Abbildung 40:



**Abbildung 40:** Cortisolkonzentration im Speichel nach Applikation des 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten Ipsapiron bzw. nach Placebo (Hennig et al., 1996)

Nimmt man beide Ergebnisse zusammen, so korrelierte der Abfall der CD4<sup>+</sup>-Zellen signifikant mit dem durch Ipsapiron induzierten Anstieg an Cortisol. Eine spezifische 5-HT<sub>1A</sub>-Stimulation führt also über den vermittelnden Einfluss von Cortisol zu einer Reduktion des Anteils an CD4<sup>+</sup>-Zellen.

Periphere T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>-Zellen) scheinen die Eigenschaft zu haben, auf verschiedenste Stimuli zu reagieren, die jedoch nicht von einer typischen Antigen-Struktur ausgehen müssen wie dies beispielsweise im Falle einer Infektion vorkommt

(Hennig et al., 1996). So konnte gezeigt werden, dass sowohl bestimmte Entspannungstechniken (Kiecold-Glaser et al., 1984) als auch kurzfristige sportliche Anstrengungen (Hickson et al., 1991) oder die Exposition der Versuchspersonen gegenüber Kälte (Hennig et al., 1993) zur Verschiebung der relativen Anzahl an peripheren CD4<sup>+</sup>-Zellen und auch zu deren absoluter Reduktion führte.

Auch wenn der zu Grunde liegende Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, wird eine Beteiligung regulierender Hormone angenommen werden dürfen. Dies ist in den o.g. Beispielen überwiegend auf Glucocortikoide (z.B. Cortisol) zurückzuführen deren immunsuppressive Wirkung weitreichend untersucht ist.

Daneben spielen aber auch andere Hormone oder Mediatoren eine noch nicht so gut untersuchte Rolle. So ist die Präsenz von PRL-Rezeptoren auf Lymphozyten (s. Kapitel 2.2.5.2.2) ein Hinweis, dass auch dieses Hormon an der Regulation beteiligt sein könnte.

Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass ein durch unspezifische serotonerge Stimulation erreichter PRL-Anstieg im Plasma zu keiner Änderung der CD4<sup>+</sup>-Zellen führte, hier aber im Gegensatz zu dem oben erwähnten sehr ähnlichen, jedoch mit Ipsapiron durchgeführten Versuchsdesign, von Hennig et al. (1996) keine signifikante Cortisoländerung auftrat.

Der offensichtliche Grund einer ausbleibenden Veränderung scheint also im ausbleibenden Cortisolresponse zu liegen. Dies legt die Vermutung nahe, dass serotonerge Stimulationen einen zellassozierten Effekt nicht über PRL, sondern via Cortisol vermitteln.

Folgende Untersuchungen sollten Anlass geben, unsere Untersuchungen mit höheren Dosen und längeren Beobachtungszeiten zu überprüfen:

- Bei Tieren mit einem PRL-Mangel konnte gezeigt werden, dass sich nach PRL-Administration bzw. nach Implantation von PRL-sezernierenden Tumorzellen die Zahl der zirkulierenden CD4<sup>+</sup>-Zellen anstieg sowie die Proliferation und IL-2-Produktion verstärkt wurde.
- In tierexperimentellen Untersuchungen an Mäusen konnte festgestellt werden, dass PRL sowohl die Entwicklung als auch die Freisetzung von T-Lymphozyten aus dem Thymus beeinflusst (Yu-Lee, 1997). In welcher Weise der Einfluss dabei ausgeübt wird, hängt u.a. von der PRL-Konzentration ab. Diese glockenförmige Beziehung wurde bereits im Theorieteil in Kapitel 2.3.1 dargestellt. In unserer Untersuchung lagen die erreichten PRL-Werte mit  $8,4 \pm 2,8$  ng/ml noch deutlich im Bereich unter den Werten der Hyperprolaktinämie.
- Bei Menschen mit übermäßig erhöhten PRL-Werten konnten aber von Köller et al. (1997) keine Änderungen der Zellzahlen nach nach signifikantem Abfall der PRL-Werte feststellen. Auch Gala (1991) berichten von keinen veränderten CD4<sup>+</sup>-Zellzahlen bei Kindern mit angeborenem PRL-Mangel.

Aus diesen und unseren Ergebnissen lässt sich schliessen, dass PRL für sich alleine keinen Effekt auf die Anzahl der CD4<sup>+</sup>-Zellen in der Peripherie hat. Vielmehr scheinen die beobachteten Änderungen in anderen Studien auf einen nicht näher untersuchten Synergismus mit anderen Substanzen zurückzuführen zu sein.

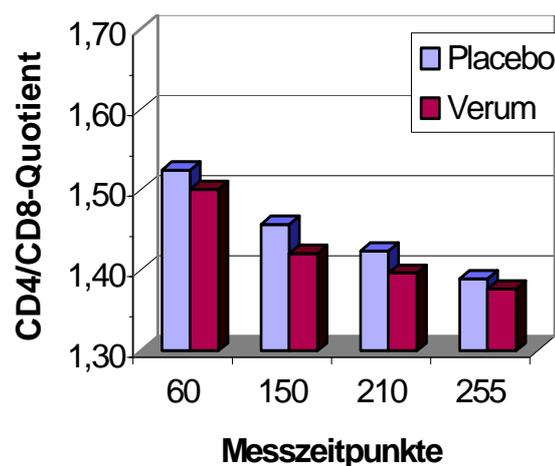
### CD8<sup>+</sup>-Zellen und das CD4/CD8-Verhältnis

Auch unter den CD8<sup>+</sup>-Zellen zeigen sich wie bei den T-Helferzellen teils widersprüchliche Studienergebnisse, die genauer betrachtet werden sollten.

Bei Kindern, die eine Minderanlage der Hypophyse aufwiesen, konnten neben einer vermehrten B-Zellzahl und unveränderten CD4<sup>+</sup>-Zellen eine Vermehrung bei den CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Suppressorzellen festgestellt werden. Dies resultierte in einem erniedrigten CD4/CD8-Verhältnis (Gupta ,1983). Allerdings konnten diese Befunde wiederum von anderen Studien nicht bestätigt werden (Gala et al., 1991).

Bei Patienten mit *Hyperprolaktinämie* konnte eine Reduktion der Anzahl der CD8<sup>+</sup>-Zellen festgestellt werden (Yu-Lee, 1997) woraus sich schließen lässt, dass diese T-Suppressorzellen als Subpopulation der T-Zellen empfänglich sein könnten für PRL. Dies lässt sich auch aus der im Theorieteil aufgezeigten PRL-Rezeptorverteilung ersehen, wonach ca. 70% der CD8<sup>+</sup>-Zellen den PRL-Rezeptor aufweisen (s.Kap. 2.2.5.2). Da diese CD8<sup>+</sup>-Reduktion nicht mit einer gleichzeitigen Steigerung der CD4-Zahl einherging, kam es zu einem kleineren CD4/CD8-Verhältnis. Diesen Sachverhalt konnten auch Köller et al. (1997) aufzeigen, jedoch korrelierte das CD4/CD8-Verhältnis nicht mit dem durch BCR gesenkten PRL-Prolaktinspiegel.

Die Ergebnisse des CD4/CD8-Quotienten in unserer Studie zeigen sich in der folgenden Abbildung 41:



**Abbildung 41:** Gegenüberstellung der Verhältnisse der CD4<sup>+</sup>-Zellen zu den CD8<sup>+</sup>-Zellen im Verlauf der vier Messzeitpunkte unter Placebo und dex-Fenfluramin.

Insgesamt kommt es sowohl bei den Werten für Placebo- als auch für Verumapplikation zu einem Abfall der CD4/CD8-Quotienten um etwa 9%. Es liegt aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Bedingungen vor, so dass man davon ausgehen kann, dass der leichte Rückgang des Verhältnisses auf den tageszeitlich bedingten Verlauf der Zellzahlen zurückzuführen ist und nicht durch einen ansteigenden PRL-Spiegel beeinflusst wird.

Die Ergebnisse von Köller stehen somit im Einklang mit den eigenen Ergebnissen die keinen Zusammenhang zwischen dem CD4/CD8-Verhältnis und dem PRL-Spiegel zeigen konnten.

### **5.5.6 Zusammenfassende Beurteilung der Zellveränderung unter d-Fen:**

Betrachtet man die Zusammensetzung der Leukozyten, kann man zusammenfassend feststellen, dass die zentrale serotonerge Stimulation mittels dex-Fenfluramin keinen Einfluss auf die Gruppe der Lymphozyten (einschließlich B-, T-, CD4- und CD8-Subpopulationen) zeigt, wohingegen die Granulozyten mit den Eosinophilen und die Monozyten deutlich auf einen serotonergen Stimulus reagieren. Beide Zelltypen wiesen nach dex-Fenfluramin höhere Werte zirkulierender Zellen auf als unter der physiologisch zirkadianen Rhythmik.

Lymphozyten müssen also grundsätzlich anders auf die durch dex-Fenfluramin ausgelösten Mechanismen reagieren als Monozyten und Eosinophile. Auf die möglichen unterschiedlichen Reaktionen auf endogene Veränderungen und die Mechanismen der Zellzahländerung wird in den folgenden Kapiteln eingegangen. Eine Eigenschaft der Lymphozyten, die Monozyten und Granulozyten nicht besitzen ist, beispielsweise die Fähigkeit zur Rezirkulation, d.h. es gibt hier eine zusätzliche Möglichkeit des Immunsystems, in die Zellzahlen im Blut regulierend einzugreifen.

## **5.6 Diskussion der Abläufe, die eine Zellzahlveränderung in der peripheren Blutzirkulation hervorrufen können**

Die Zahl der im Blut zirkulierenden Immunzellen ist als „offenes System“ zu betrachten und zeigt, wie bei den Veränderungen unter der Placeboapplikation deutlich zu sehen ist, keinesfalls ständig konstante Werte. Dieser kontinuierlichen Zu- und Abnahme der Zellen liegen verschiedene Mechanismen zu Grunde, die in Bezug auf unsere Studie kurz diskutiert werden sollen.

Prinzipiell gibt es mehrere Möglichkeiten, die Zellzahlveränderungen hervorrufen können: 1) Proliferation, 2) Apoptose, 3) Freisetzung aus gepoolten Zellansammlungen, 4) Margination, 5) Migration und 6) Rezirkulation.

- 1.) Durch Proliferation der Zellen in den lymphatischen Organen können sich die Zellzahlen um ein Vielfaches vermehren. So vermag beispielsweise PRL die Proliferation von T-Zellen durch Aktivierung des IRF-1 Gens zu induzieren (Yu-Lee, 1997). Dieser Vorgang liegt aber in einem zeitlichen Rahmen von mehreren Stunden bis Tagen. So ist in dem von uns untersuchten Zeitraum (ca. 4,5 h) nicht davon auszugehen, dass die gemessenen Veränderungen auf proliferative Vorgänge zurückzuführen sind.
- 2.) Die Apoptose von Zellen könnte ebenfalls zu veränderten Werten beitragen. Genau wie bei der Proliferation haben auch bei der Apoptose exogene Substanzen Einfluss auf das Apoptoseverhalten. So kann PRL einer steroidinduzierten Apoptose von T-Zellen entgegenwirken (s.Kap. 2.3.1.2). Aber auch hier ist in dem betrachteten Zeitfenster nicht mit derartigen messbaren Veränderungen zu rechnen, selbst falls dieser Effekt eintreten würde.
- 3.) Nur der kleinste Teil (<10%) der Leukozyten befindet sich in der peripheren Blutzirkulation, der Rest verteilt sich auf die primären und sekundären lymphatischen Organe und das Gewebe. Insbesondere die Milz und das Knochenmark (Felten et al., 1987, Besedovsky, 1996) stellen Speicher für die Immunzellen dar. Bei einem entsprechenden Stimulus können kurzfristig vermehrt Zellen ausgeschüttet oder deren Freisetzung reduziert werden. So gibt es Hinweise, dass vegetative Nervenendigungen beispielsweise in der Milz in direktem Zusammenhang stehen mit den dort gepoolten Immunzellen. Eine Erregung auf nervalem Weg kann so zu einer Freisetzung der Zellen aus der Milz führen bzw. diese verzögern (Felten et al., 1987, Besedovsky, 1996) (s. auch Kap. 5.7). Diese Vorgänge sind bei unseren Ergebnissen somit zu berücksichtigen.
- 4.) Nachdem Immunzellen aus dem Knochenmark freigesetzt werden, gelangen nicht alle in den mobilen, zirkulierenden Pool. Ca. 50% der Zellen (Pabst & Binns, 1992) sind primär nicht mobil, sondern mehr oder weniger stark an den Endothelzellen durch Adhäsion gebunden. Je nachdem, wie stark dieser Anteil variiert, können kurzfristige Schwankungen der Zellzahlen in beide Richtungen möglich werden, also Effekte die in unseren Veränderungen eine Rolle spielen können.

- 5.) Alle Zellen des Immunsystems besitzen die Fähigkeit zur Migration. Mittels Diapedese verlassen die Leukozyten die Kapillaren durch die Endothelwand der Kapillaren. Dieser Prozess wie auch die Geschwindigkeit, mit der sich die Leukozyten fortbewegen, ist von einer großen Zahl an Faktoren abhängig, wie beispielsweise endokrine Substanzen. Auch diese Kinetik muss in die Betrachtung der von uns erzielten Zellzahlveränderungen mit einbezogen werden.
- 6.) Im Gegensatz zu der Fähigkeit der Migration haben nur die Lymphozyten die Möglichkeit zur Rezirkulation (Janeway & Travers, 1997). Nach der Migration aus dem Blutkreislauf, gelangen Lymphozyten u.a. ins lymphatische System, können dort auf dem Weg der Lymphbahnen in den Ductus thoracicus gelangen und anschließend in den venösen Teil der Blutzirkulation. Eine erneute Migration ist dann wieder möglich. Es zeigt sich also, dass die Lymphozyten den anderen Leukozyten in Bezug auf ihre „Mobilität“ überlegen sind.

Es lässt sich festhalten, dass eine zahlenmäßige Veränderung der weißen Blutkörperchen bzw. eine prozentuale Verschiebung innerhalb ihrer Subpopulationen im betrachteten Zeitfenster von ca. 4 Stunden auf die Migration, die Freisetzung aus den gepoolten Lokalisationen, der Margination und der Rezirkulation der Lymphozyten bzw. deren Untergruppen zurückzuführen ist. Diese kontinuierlich im physiologischen Milieu stattfindende Wanderung vom lymphatischen Gewebe über die Lymphbahnen in die Peripherie, also ins Blut, aber auch die Migration von der Blutstrombahn durch das Kapillarendothel ins umliegende Gewebe sind hauptverantwortlich für diese relativ raschen Veränderungen der Präsenz der Leukozyten im Blut.

Die speziell auf die Gruppe der Lymphozyten beschränkte Fähigkeit der Rezirkulation könnte so einen Grund für die nur bei den Lymphozyten ausbleibende Reaktionen auf einen serotonergen Stimulus darstellen.

### **5.7 Diskussion möglicher Mechanismen der Vermittlung zwischen dem stimulierten zentralen serotonergen System und der peripheren Immunzellverschiebung**

Wie in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt, führt die serotonerge Provokation durch dex-Fenfluramin zu Veränderungen in der Zahl der zirkulierenden Zellen. Folglich stellt sich die Frage, über welche Mechanismen die Stimulation im zentralen serotonergen System auf die Immunzellen übertragen wird. Für diese „Vermittlerrolle“

sind eine Reihe von Möglichkeiten denkbar, die sowohl einzeln, aber auch im Verbund, zu den dargestellten Effekten auf die Immunzellen führen können. Im Folgenden sollen diese potenziellen Vermittler, die in das Studiendesign unseres Versuchsaufbaus hineinpassen, – PRL, Cortisol, 5-HT, dex-Fenfluramin, endogene Opiode, vegetatives Nervensystem, Zytokine – diskutiert werden.

### 5.7.1 PRL als Vermittler

An erster Stelle steht das Peptidhormon Prolaktin, dessen Einflüsse auf das Immunsystem ausführlich in den Kapiteln 2.2.5.2 und 2.3 dargestellt wurde.

Da es neben den immunmodulierenden Eigenschaften auch im Zusammenhang mit einer serotonergen Stimulation zu einer Zunahme der PRL-Serumlevel kommt (s. Kap. 2.1.6.2), liegt der Schluss nahe, dass es sich hier um einen möglichen Vermittlerkandidaten handeln könnte.

Die berechneten Korrelationen nach Pearson zwischen den Veränderungsmaßen der PRL-Werte und den Immunzellzahlen zeigen, dass sich bei den meisten Werten keine signifikanten Korrelationen ergeben. Dies spricht für die Unabhängigkeit des durch dex-Fenfluramin erreichten PRL-Anstiegs und den Veränderungen der Immunzellen. Insbesondere gilt dies für die als signifikant veränderten Zellzahlen der absoluten Zellzahlen der Eosinophilen und Monozyten und der prozentualen Zunahme der Monozyten. Gleiches gilt für die Tendentielle Zunahme der prozentualen Anteile der Eosinophilen und Lymphozyten.

Wie in Kapitel 4.6.1 und 4.6.2 dargestellt, kam es rechnerisch zu positiven signifikanten Korrelationen der absoluten Zahl der B- und CD4-Zellen bzw. des prozentualen Anteils der B-Zellen mit den PRL-Veränderungen obwohl diese Zellen für sich nicht signifikant durch dex-Fenfluramin beeinflusst wurden. Die Erklärung zu diesem Sachverhalt liefert die graphische Darstellung wie sie in den Abbildungen 33a-c (s.Kap. 4.6) wiedergegeben ist. Bei allen drei rechnerisch signifikanten Korrelationen zeigt sich, dass dies durch wenige „Ausreisser“ bedingt ist. Liesse man jeweils diese zwei bzw. drei Extremwerte ausser acht, würde die Korrelation sofort insignifikant und stünde im Einklang mit den anderen errechneten Werten.

Auf der anderen Seite lässt sich aus diesen wenigen, sehr stark ausgeprägten Werten einiger Probanden ein weiterer Schluss ziehen. Diejenigen Versuchsteilnehmer, die auf die Applikation von dex-Fenfluramin mit einem sehr starken PRL-Anstieg reagierten, also eine deutliche serotonerge Stimulierbarkeit aufwiesen, zeigen auch die stärksten Veränderungen in den absoluten B-Zellzahlen. Man muss hier folglich die Möglichkeit einer Art „Schwellenkonzentration“ für PRL in Betracht ziehen, die erst überschritten werden muß, um immunologische Veränderungen hervorrufen zu

können. Diese Schwellenüberschreitung ist bei der von uns niedrig dosierten dex-Fenfluramin-Menge jedoch zu selten aufgetreten und legt somit die Wiederholung eines solchen Versuchsaufbaus an den Tag, in dem unter ansonsten gleichen Bedingungen, höhere PRL-Werte erreicht werden. Diese Beobachtung stünde dann wiederum in Einklang mit den Befunden von Reber (1993) bringen, der in seinem Übersichtsartikel den Zusammenhang von hohen PRL-Werten und hohen Immunzellzahlen bei Autoimmunerkrankungen oder Transplantatabstoßungsreaktionen aufzeigt. Siehe dazu auch die Ausführungen im Kapitel 2.3.2.

Eine andere mögliche Vermittlung ist auf dem Weg der Cytokine denkbar. So führt PRL zu einer verstärkten Freisetzung von IFN- $\gamma$  (Anisman et al., 1996), das wiederum Einfluss auf Leukozyten besitzt und durch seine immunologische Kompetenz zu Veränderungen führen kann.

Die ansteigende Tendenz der zirkulierenden Neutrophilen in Zusammenhang mit PRL ließe sich in Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen bringen. Kelly (1992) zeigte die Anwesenheit von PRL-Rezeptoren auf Neutrophile. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die in vitro Zugabe von PRL oder GH die Chemotaxis der Zellen inhibierte. Fornari et al. (1994) konnten an Patienten mit einer pathologischen Hyperprolaktinämie zeigen, dass deren Neutrophile im Vergleich zur gesunden Kontrolle eine verminderte Chemotaxis aufwiesen. Auch die Spontanmigration war signifikant reduziert. Dies könnte eine Verbindung zu der in unserer Studie festgestellten vermehrten Anzahl an zirkulierenden neutrophilen Granulozyten herstellen.

In unserer Studie konnten wir keinen signifikanten Effekt auf die Zahl der B-Zellen feststellen, trotz erfolgter serotonerger Stimulation und PRL-Anstieg. Dass PRL aber prinzipiell einen Einfluss auf die B-Zellen haben kann, belegen viele Quellen wie etwa Weigent et al. (1996), die davon ausgehen, dass PRL für die Proliferation und adäquate Funktion von B-Zellen essentiell ist. Dies würde sich wiederum mit der o.g. „Schwellentheorie“ in Einklang bringen lassen. Siehe dazu auch die Ausführungen im Kap.2.3.2.3.2. Betrachtet man den Trend in der prozentualen Zusammensetzung der Lymphozyten gegen Ende der Untersuchung (Abb. 32), in der die max. PRL Spiegel vorliegen, erkennt man unter Verumbedingungen bei den B-Zellen eine zunehmende Tendenz, während bei den T-Zellen eine Abwärtstendenz sichtbar wird. Dies steht in Übereinstimmung mit den Befunden von Reber (1993), die bei Patienten mit erhöhten PRL-Spiegeln eine selektive Verstärkung der B-Zell-Komponente beschrieben.

Bei Tieren mit einem PRL-Mangel konnte gezeigt werden, dass nach PRL-Gabe die Zahl der zirkulierenden CD4<sup>+</sup>-Zellen anstieg sowie die Proliferation und IL-2 Produktion verstärkt wurde. Schließlich konnte in tierexperimentellen Untersuchungen festgestellt werden, dass PRL sowohl die Entwicklung aber auch die Freisetzung von T-

Lymphozyten aus dem Thymus beeinflusst (Yu-Lee, 1997). In welcher Weise der Einfluss dabei ausgeübt wird, hängt u.a. von der PRL-Konzentration ab. Diese wurde bereits im Theorieteil in Kapitel 2.3.1 dargestellt.

Eine von vielen Autoren beschriebene generelle Stimulation von Lymphozyten (z.B. Reichlin, 1998 u. Kap. 2.3.2.3) durch PRL konnte, wie in unserer Studie gezeigt, nicht auf den Sachverhalt der Anzahl der zirkulierenden Lymphozyten übertragen werden. Die Stimulation macht sich primär in intrazellulären Aktivierungsvorgängen bemerkbar und erst im weiteren Verlauf einer immunologischen Reaktion bzw. in Kooperation mit anderen Parametern kann sich eine PRL-Stimulation auch auf die Immunzellzahlen der Lymphozyten auswirken.

Aus dem Gesagten und den eigenen Ergebnissen lässt sich somit schlussfolgern, dass ein leichter PRL-Anstieg, wie er im Rahmen einer serotonergen Stimulation durch dex-Fenfluramin Applikation in der Regel erfolgt, nicht in direktem Zusammenhang mit einer Immunzellveränderung steht. Den resultierenden Veränderungen der Immunzellen liegen somit andere Mechanismen zugrunde die im weiteren dann noch diskutiert werden. Allerdings könnte ein starker PRL-Anstieg durch ein sensibel reagierendes serotonerges System dann wiederum in einen direkten Zusammenhang mit den Zellen gebracht werden. Dies müsste in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

### **5.7.2 Cortisol als Vermittler**

Der Vollständigkeit halber wird hier noch einmal der Cortisoleinfluss erwähnt. Das Corticosteroidsystem wird vom serotonergen System mit beeinflusst und hat selbst wiederum hinreichend bekannte Einflüsse auf immunologische Faktoren, wie sie bereits im Kapitel 5.2 kurz dargestellt wurden. Da diese Größe aber in unserer Studie zwar mitberücksichtigt worden ist, aber durch die serotonerge Stimulation mit 15 mg dex-Fenfluramin keine signifikante Veränderung im Serumspiegel auftrat, soll in diesem Zusammenhang nicht weiter darauf eingegangen werden. Es kann nämlich davon ausgegangen werden kann, dass zwischen Placebo und Verumapplikation kein dex-Fenfluramin induzierter, cortisolvermittelter Unterschied hinsichtlich der Wirkung auf Leukozyten auftrat. In anderen Untersuchungen mit serotoninstimulierenden Substanzen, die ein deutlicheres Ansprechen des Steroidsystems nach sich ziehen, muss Cortisol als Vermittler selbstverständlich berücksichtigt werden.

### 5.7.3 Serotonin als Vermittler

Ravindran et al. (1999) untersuchten die Auswirkungen einer tryptophanfreien Diät auf endokrine, psychische und immunologische Auswirkungen hin. Neben den dadurch verminderten Spiegel an Tryptophan und 5-HT im Plasma kam es zu einer Stimmungsreduktion der männlichen Probanden verglichen mit der Gruppe mit ausgeglichener Diät. Die reduzierten Spiegel waren nicht von einer Änderung der Zellproliferation oder Cytokinproduktion begleitet. Die Gabe von dex-Fenfluramin führte zur Wiederherstellung der Tryptophan und 5-HT-Spiegel, aber auch hier stellten sich keine immunologischen Veränderungen ein.

In Bezug auf unsere Studie lässt sich sagen, dass falls es nach einer einmaligen niedrigdosierten Gabe von dex-Fenfluramin zu einem *peripheren* 5-HT-Anstieg gekommen wäre, dieser sich nicht auf die bestimmten Zellparameter ausgewirkt hätte. Dieser potenzielle Einfluss kann damit in der Diskussion sicherlich in den Hintergrund gerückt werden, obwohl die Einflüsse von 5-HT auf das Immunsystem (s.a. Kap. 2.1.5) von Bedeutung sein können, wenn sie in größerem Ausmaß vorhanden sind.

### 5.7.4 Dex-Fenfluramin als Vermittler

Auch die Substanz dex-Fenfluramin selbst muss bei der Betrachtung der Zellveränderungen mit berücksichtigt werden. Neben seinem bereits besprochenen Einfluss auf das zentrale dopaminerge System und opioide System gibt es auch Hinweise, die einen direkten Effekt auf Immunzellen zeigen:

So zeigten Studien an Ratten, dass nach der Verabreichung verschiedener serotoninfreisetzender Amphetaminderivate auch dex-Fenfluramin die Zahl der zirkulierenden Lymphozyten reduzieren konnte. Daneben kam es zu einer Suppression der Con-A stimulierten Proliferation, der Reduktion der IFN- $\gamma$ - und IL-10-Produktion in den Zellkulturen. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe einen Rückgang der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -Produktion im Vollblut aufzeigen, was auf eine reduzierte Aktivität der Monozyten/Makrophagen zurückzuführen sei (Conor et al., 2000). Diese Untersuchungen ließen sich in Einklang mit unseren Ergebnissen bringen, insofern als eine prinzipielle immunstimulierende Eigenschaft des PRL auf Lymphozyten durch die direkten Effekte von dex-Fenfluramin antagonisiert werden und so letztlich kein Effekt auf die zirkulierenden Lymphozytenzahlen zu sehen ist.

Zu etwas anderen Ergebnissen kam die Gruppe um Mathews (1996), die die Auswirkung einer dex-Fenfluramin-Administration auf die Potenz der Lymphozyten auf eine Candida-Infektion zu reagieren, untersuchten. Sie konnten einen stärkeren Anstieg der Zahl der CD3<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen in der Tiergruppe feststellen, die dex-Fenfluramin erhielt. Außerdem zeigten diese Zellen eine höhere antifungale Kompetenz. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei Studien, die einen endokrin-immunologischen Zusammenhang untersuchen, zu unterscheiden ist, ob gleichzeitig ein Antigen-Stimulus vorhanden ist. Dies kann dann zu scheinbar unterschiedlichen Ergebnissen führen, wenn man diese Studie im Zusammenhang mit den eigenen Ergebnissen betrachtet.

Eine längerfristige Einnahme von dex-Fenfluramin über 3-6 Monate, wie sie beispielsweise im Rahmen einer Adipositas therapie verabreicht wurde, hat nach Mac Tavish (1992) keinen Einfluss mehr auf die Zahl der Leukozyten im Blut. Dies ist durch Anpassungsvorgänge auf Rezeptorebene erklärbar. Ein anhaltender serotonerger Stimulus kann zu einer Downregulation von 5-HT-Rezeptoren führen und so die Sensitivität auf ein Ansprechen senken.

Sicherlich ist es nicht einfach zu beurteilen, ob in den o.g. in vivo Studien mit dex-Fenfluramin nun tatsächlich dieser Stoff die auslösende Substanz darstellt bzw. diese Reaktionen auf indirektem Wege vermittelt sind. Besser eignen sich dazu in vitro Studien, die eher einen direkten Mechanismus nachweisen können. Leider gibt es diesbezüglich nicht allzu viele Studien:

Eine in vitro Studie mit humanen Lymphozyten von Mathews et al. (1998) lässt sich insofern nur bedingt vergleichen, da es sich um mit HI-Viren befallene Zellen handelt. Aber es wurden immerhin direkte Effekte von d-Fen auf Lymphozytenkulturen bestimmt. In ihren Ergebnissen konnten sie Folgendes zeigen:

D-Fen konnte die Fähigkeit von CD8<sup>+</sup>-Zellen heraufsetzen in Bezug auf deren Potenzial, *C. albicans* im Wachstum zu unterdrücken. Die CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden in ihrer Proliferation durch Con-A gefördert. Weiterhin konnten sie zeigen, dass sich die Zahl der IFN- $\gamma$  produzierenden CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen vermehrte. Dies sowohl bei infizierten wie auch bei nichtinfizierten Zellen.

### **5.7.5 Endogene Opiode:**

Neben den eben angeführten Mechanismen werden auch noch andere Mediatorwege diskutiert. Vieles spricht für eine Beteiligung des Opioidsystems an der Interaktion von zentralen serotonergen Vorgängen und Auswirkungen auf das IS (Pasnik, 1999). Wie bereits im Kap. 2.3.2 dargestellt, beteiligen sich auch „Neuropeptide“ bzw. „endogene Morphine“ an der Regulation der Migration. Zu diesen Neuropep-

tiden zählen u.a. die Substanz P,  $\beta$ -Endorphin und met-Enkephalin. Diese können sowohl als Neurotransmitter, Neuromodulatoren und als Hormon wirksam sein. So konnten Opioid-Rezeptoren auf Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten nachgewiesen werden, die in der Modulation der Immunzellfunktion miteingebunden sind (Harvath, 1992). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ -Endorphin oder met-Enkephalin in physiologischen Konzentrationen aktivierend auf Neutrophile hinsichtlich der Chemotaxis und Migrationsfähigkeit wirken. Die Zugebe des Opiatantagonisten Naloxon konnte diesen Effekt blockieren (Pasnik et al., 1999; Wiedermann et al., 1994). Zu etwas anderen Ergebnissen kamen Untersuchungen von Pasotti et al. (1992a u. 1993), die einen in vitro inhibitorischen Effekt durch Morphin auf die Chemotaxis von PMN zeigen konnten, der durch Naloxon antagonisierbar war. Sie betonten insbesondere die Bedeutung des  $\mu$ -Rezeptors bei der Vermittlung auf PMNs.

Somit stellt sich die Frage, ob durch die von uns erzeugte serotonerge Stimulation mittels d-Fen auch Auswirkungen auf die endogenen Opioide entstehen und so ein zusätzlicher Faktor entsteht, der die Immunzeleigenschaften modulieren kann. In der Literatur findet man folgende Hinweise dazu:

In *Drugs* schreibt Mc Tavish (1992, p.716): „...gibt es einige Hinweise, dass dex-Fenfluramin Acetylcholin-, GABA-,  $\beta$ -Endorphin- und  $\beta$ -Enkephalin-Spiegel beeinflusst,...“. Zangen et al. (1999) untersuchten die Zusammenhänge von serotonerger Stimulation und  $\beta$ -Endorphinveränderungen im ZNS im Tiermodell mittels Mikrodialyse im Nucleus accumbens: Eine spezifische Läsion der serotonergen Zentren hatte eine Reduktion der  $\beta$ -Endorphinspiegel zur Folge. Die lokale Applikation von 5-HT hatte steigende Werte zur Folge. Die Autoren schlossen daraufhin auf einen positiven Zusammenhang von serotonerger und Endorphin-System im ZNS.

Dagegen konnten Andersson et al. (1991) in einer Studie an übergewichtigen Frauen durch die Gabe von 30 mg dex-Fenfluramin pro Tag für 4 Tage keine Änderung der  $\beta$ -Endorphinspiegel im Serum feststellen. Hier ist allerdings zu berücksichtigen, dass durch die Auswahl der Probanden eine deutlich reduzierte Dosis bezogen auf kg x KG resultierte sowie zwischen einem peripheren und zentralen Anstieg unterschieden werden muss.

Maes (1996) konnte zeigen, dass eine einmalige Dosis von L-5-Hydroxytryptophan bei Patienten mit endogener und reaktiver Depression zu einer verstärkten Freisetzung von  $\beta$ -Endorphin nach Dexamethasonsuppression führt, nicht aber bei der Minor-Depression.

Battistella (1996) untersuchten die Auswirkung einer indirekten serotonergen Stimulation mit L-5-Hydroxytryptophan an Kindern mit Migräne und stellten darunter einen tendenziell gestiegenen  $\beta$ -Endorphinspiegel sowohl im Plasma als auch innerhalb mononukleären Zellen fest.

In einem Tiermodell untersuchten Chaido et al. (1993) den Effekt von Rimorphin, einem  $\kappa$ -Opiat-Agonisten, auf das Immunsystem im Zusammenhang mit dem serotonergen System. Sie fanden einen immunsuppressiven Effekt nach der Gabe von Rimorphin. Die Durchtrennung des Hypophysenstiels konnte diesen inhibitorischen Effekt verhindern. Auch eine Blockade von postsynaptischen 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren konnte diesen opioidinduzierten immunsuppressiven Effekt verhindern. Sie schlossen daraus, dass der Opioid-Effekt auf das Immunsystem nur im Zusammenwirken mit dem serotonergen System erfolgen kann.

Auch die Verkettung von endogenen Opioiden mit dem Peptidhormon Prolaktin bietet Anhaltspunkte für weitere Mechanismen. Einer davon ist beispielsweise die Regulation mittels Opioiden. Hinweise darauf geben Untersuchungen (Yatham & Steiner, 1993), die einen verminderten PRL-Anstieg nach Vorbehandlung mit dem Opiatantagonisten Naloxon zeigen. Dies würde für eine mögliche Beteiligung des Opioid-Systems in der serotonerg, prolaktin involvierten Auswirkung auf das IS sprechen.

Weitere Indizien geben auch die Untersuchungen von Sagrillo & Voght (1992), die versuchten, das Zusammenwirken von  $\beta$ -Endorphin und 5-HT auf PRL an Ratten darzustellen. Mit Hilfe von Rezeptorblockern und -stimulatoren konnten sie einen stimulierenden Effekt von  $\beta$ -Endorphin auf die PRL-Sekretion darstellen. Die Einbeziehung der serotonergen Komponente erbrachte, dass der serotonerg stimulierende Effekt auf die PRL-Freisetzung zumindest teilweise über die Opioid-Rezeptoren vermittelt zu sein scheint (s. auch Kap. 5.1.2). Der Einsatz des 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten Ketanserin führte zu der Erkenntnis, dass eine  $\beta$ -endorphininduzierte PRL-Freisetzung nicht 5-HT<sub>2</sub>-vermittelt ist.

Die genauere Frage nach dem vermittelnden 5-HT-Rezeptor, der für den  $\beta$ -Endorphinanstieg verantwortlich ist, wurde von Bagdy (1990) untersucht. Sie verwendeten dazu den 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten 8-OH-DPAT, den 5-HT<sub>1C</sub>-Agonisten m-CPP und den 5-HT<sub>2</sub>-Agonisten DOI (Abkürzungen und einen Überblick gibt auch Tab. 3 wieder!). Alle drei zeigten *in vivo* einen Anstieg von  $\beta$ -Endorphin. Diese Freisetzung konnte aber durch Dexamethasonvorbehandlung, durch Hypophysenstieltrennung und durch Antikörper gegen CRH verhindert werden. Der direkte Effekt auf die Zellen der Hypophyse konnte *in vitro* gezeigt werden, wobei die 5-HT-Agonisten DOI einen starken, m-CPP einen mittleren und 8-OH-DPAT gar keinen stimulierenden Einfluss auf die  $\beta$ -Endorphinfreisetzung zeigten.

Eine andere Studie konnte zeigen, dass die beiden 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten Ipsapiron und 8-OH-DPAT unterschiedlich stark auf die  $\beta$ -Endorphinfreisetzung wirken (8-OH-DPAT etwa 40-mal stärker), in Bezug auf den PRL-Release aber vergleichbar sind (Di Scullo, 1990).

Eine anatomische Erklärung für das Zusammenspiel von 5-HT und endogenen Opioiden liefert eine chinesische Untersuchung von Fan, Li und Kong (1993). Sie zeigten die Coexistenz mehrerer neurotroper Substanzen im Nucleus Raphe Magnus (NRM) wie 5-HT, Substanz P und Enkephalin. Dabei wurde sogar die gleichzeitige Präsenz von zwei Substanzen im gleichen Neuron oder Vesikel entdeckt, wie beispielsweise 5-HT mit Substanz P, Enkephalin oder TRH.

Es zeigt sich, dass die Ergebnisse nicht einheitlich sind, was eine serotonerge Stimulation auf den  $\beta$ -Endorphinspiegel betrifft, da es sich z.T. um sehr unterschiedliche Studiendesigns handelt. Bei zukünftigen Studien, die eine Stimulation des serotonergen System zum Ziel haben, ist die Berücksichtigung der endogenen Opiode somit von Bedeutung, wenn man alle Einflussfaktoren in ihren Effekten abschätzen will.

Ein weiterer Faktor den es zu berücksichtigen gilt, ist das Ansprechen von Immunzellen auf Hormone/Neurotransmitter *mit* oder *ohne* gleichzeitiger Anwesenheit von Antigenen. Diesen Unterschied in der Reaktion der Zellen zeigten Lieb et al. (1996) bei Monozyten. Diese reagierten in absolut endotoxinfreier Kultur auf die Zugabe von  $\alpha$ -Endorphin,  $\beta$ -Endorphin oder Substanz-P *nicht* mit einem Anstieg der Synthese von IL-1 und IL-6. Jedoch konnte bereits eine minimale Menge an LPS in der Kultur einen synergistischen Effekt mit den Neuropeptiden erreichen.

Eine gesteigerte Migration mit sinkenden Neutrophilen aufgrund potentieller Vermittlung durch  $\beta$ -Endorphin und met-Enkephalin (Pasnik, 1999, Wiedermann, 1994) konnte in unseren Ergebnissen nicht aufgezeigt werden. Vermutlich war der durch dex-Fenfluramin hervorgerufene stimulatorische Effekt auf das endogene Opioidsystem nicht stark genug ausgeprägt, bzw. wurden die Effekte durch andere Faktoren wie z.B. den ansteigenden PRL-Spiegel antagonisiert. Dafür stehen unsere Ergebnisse im Konsens mit den Untersuchungen von Pasotti et al. (1992a, 1993), die einen *in vitro* inhibitorischen Effekt von Morphin auf die Chemotaxis von Neutrophilen zeigten. Die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse sind vermutlich auf die unterschiedliche Opioid-Rezeptoraffinität von Morphin bzw. Endorphin/Enkephalin zurückzuführen.

Daraus lässt sich in Bezug auf unsere Studie folgendes ableiten: Der 5-HT<sub>1A</sub>-Agonist Ipsapiron kann zu einer Freisetzung von  $\beta$ -Endorphin führen (Di Sciallo, 1990); Hennig et al. (1996) zeigten einen Abfall des prozentualen Anteils der CD4<sup>+</sup>-Zellen nach Ipsapiron. Die Applikation von dex-Fenfluramin zeigte keinerlei Einfluss auf die CD4<sup>+</sup>-Zellen. Da dex-Fenfluramin als 5-HT-Releaser gleichzeitig mehrere verschiedene prä- und postsynaptische 5-HT-Rezeptoren anspricht, muss sich ein antagonistischer Effekt derart einstellen, dass die Folgen einer spezifischen 5-HT<sub>1A</sub>-Reaktion über einen weiteren 5-HT-Rezeptor geblockt wird.

### 5.7.6 Das vegetatives Nervensystem als Vermittler

Auch der Tonus des vegetativen NS hat Einflussmöglichkeiten auf die immunologische Kompetenz. Denn es konnte gezeigt werden, dass es anatomische Verbindungen in Form von vegetativen Nervenfasern gibt, die eine direkte morphologische Verbindung vom ZNS zu den primären (Thymus, Knochenmark) und sekundären (Milz, Lymphknoten) lymphatischen Organen herstellen (Felten et al., 1987 u. Besedovsky & Del Rey, 1996). Eine zentrale vegetative Stimulation kann so auf „elektrophysiologischem“ Weg über sympathische Nervenfasern zu einer veränderten, noradrenalinmodifizierten Freisetzung aus der in der Milz gepoolten Immunzellen führen und damit die Anteile der zirkulierenden Zellen im Blut verändern (Reichlin, 1998). Aber auch die Administration von  $\beta$ -Rezeptorblockern kann zu einer Zunahme der Eosinophilen im Blut führen (Bundschuh et al., 1988). Ähnliches konnten Benschop et al. (1994) zeigen, die nach der Applikation eines  $\beta$ -Rezeptor-Blockers (Propranolol) eine Erhöhung der Anzahl aller Lymphozyten feststellen konnten. Um auch diesen Faktor in der Diskussion der dex-Fenfluramin vermittelten Zellzahländerung zu berücksichtigen, sollte überlegt werden, ob d-Fen Auswirkungen auf das vegetative NS hat.

So gibt es folgenden Hinweise eines dex-Fenfluramin induzierten Einflusses auf das vegetative Nervensystem:

Andersson et al. (1991) konnten in einer Studie an übergewichtigen Frauen durch die Gabe von 30 mg dex-Fenfluramin pro Tag einen Abfall des systolischen als auch diastolischen Blutdruckes erreichen, bei konstanter Herzfrequenz. Auch die Plasmaspiegel von Noradrenalin und Renin wurden verringert. Dies deutet auf eine verminderte sympathische Aktivität hin, die mit dex-Fenfluramin in Zusammenhang steht.

Fattaccini et al (zit.n. Tavish, 1992) untersuchten den Einfluss von dex-Fenfluramin in vitro und fanden keinen signifikanten Effekt auf den Noradrenalinanteil bzw. seine Metaboliten, wobei aber gleichzeitig Hinweise bestehen bezüglich eines Acetylcholineinflusses durch d-Fen.

Eine vegetative Auswirkung durch eine serotonerge Stimulation sollte deshalb in weiteren Studien mitberücksichtigt werden, beispielsweise durch die Erfassung von Puls- und Blutdruckmessung während des Versuchsablaufs an den Probanden. Denn sollte sich ein derartiger Effekt einstellen, ist davon auszugehen, dass auch Veränderungen der Leukozyten davon betroffen sein können.

### 5.7.7 Zytokine als Vermittler

Eine relativ neue Theorie der Steuerung des Immunsystems durch die intrinsische neuronale Aktivität des ZNS wird in einem Übersichtsartikel von Reichlin (1998) dargestellt. Man geht davon aus, dass das ZNS in der Lage ist, durch Sekretion von Zytokinen in die periphere Blutzirkulation eine immunmodulatorische Funktion auszuüben. Eine Vielzahl von immunstimulierenden Zytokinen (z.B. IL-1, -2, -6, -8, -12, TNF- $\alpha$ , CSF, etc.) und immuninhibierenden Zytokinen (z.B. IL-1-Rezeptor-Antagonist, IL-10 etc.) entstehen im ZNS. Syntheseorte sind insbesondere Neurone, Mikroglia, Astrozyten und der Plexus choroideus. Von den o.g. Zytokinen konnte für IL-1 und TNF- $\alpha$  gezeigt werden, dass sie das Gehirn in die Peripherie verlassen können. Mögliche Pfade, auf denen die Zytokine die Blut-Hirn-Schranke überwinden können sind der Liquor und „undichte“ Stellen um die Hirnnerven und Gefäße. Der Plexus choroideus, als Grenzgebiet zwischen zentralem Liquor und peripherem Blut, nimmt dabei eine wichtige Stellung ein. Neben der Zytokinproduktion werden auch zahlreiche Rezeptoren exprimiert, wie beispielsweise für Dopamin ( $D_1$ ), Serotonin, Prolactin, IL-1, Noradrenalin ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ) und TNF- $\alpha$ . Sollte also eine serotonerge Stimulation durch vermehrte zentrale Freisetzung des Transmitters mittels dex-Fenfluramin oder durch veränderte PRL-Werte zu einer Freisetzung von zentralen Zytokinen aus dem ZNS in die Peripherie führen, wäre hiermit ein alternativer Weg der Immunregulation aufgezeigt.

#### Zusammenfassend:

Die einzelnen Komponenten wirken sicherlich nicht in Eigenregie, sondern in einem Zusammenspiel vieler beteiligter Faktoren. Dies ließ sich gut am Beispiel von PRL zeigen, dessen alleinige Betrachtung, ohne die Berücksichtigung weiterer potentieller Co-Faktoren, keine direkte Korrelation mit den veränderten Zellzahlen aufwies. Bei einem synergistischen Modell führen beispielsweise die endogenen Opioiden  $\beta$ -Endorphin und Enkephalin zu einer verstärkten Freisetzung der Zytokine IL-1 und IL-2 (Anisman, 1996), während ein gleichzeitig erhöhter PRL-Spiegel die Up-Regulation der IL-2-Rezeptoren in Milzzellen und T-Lymphozyten stimuliert (Yu Lee, 1997). Die Zellen werden so in ihrem Ansprechen auf IL-2 sensibilisiert, das indirekt durch die serotonerge Stimulation verstärkt freigesetzt wird. Um diesen Ansatz der Zytokinbeteiligung zu verifizieren, wäre es wichtig, in weiteren Untersuchungen diese im entnommenen Blut mit zu bestimmen.

Die Frage, ob die Veränderung der Zellzahlen nun direkte oder indirekte Folge der verstärkten PRL-Freisetzung ist und/oder durch serotonerge Mechanismen hervorgerufen wurde, sollte in einem erneuten veränderten Versuchsansatz geklärt werden. Zusätzlich zu der serotonergen Stimulation sollte ein Dopamin-Agonist (z.B. Bromocriptin) verabreicht werden, der zu einer Hemmung der serotonerg induzierten PRL-Freisetzung führen würde. Die gleiche von uns verwendete Dosis von 15 mg dex-Fenfluramin könnte damit weder einen PRL- noch einen Cortisolanstieg hervorrufen. Käme es daraufhin zu den gleichen Veränderungen wie in unserer Studie an den Immunzellen, könnte man einen direkten PRL-vermittelten Effekt ausschließen und andere Mechanismen, wie sie oben besprochen wurden, kämen für diesen Effekt in Frage. Bei veränderten Ergebnissen könnten so Rückschlüsse gezogen werden, für welchen Teil das PRL verantwortlich ist, bzw. ab welcher Konzentrationszunahme eine Veränderung der Zellen auftritt, und was zusätzlich durch weitere Mechanismen gesteuert wird.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Studie sollten die Interaktionen des ZNS, des endokrinen und des Immunsystems näher untersucht werden. Am Beispiel einer zentralen Stimulation des Serotonin-Systems (5-HT) wurden die Auswirkungen auf die Anzahl der zirkulierenden Leukozyten im Blut bestimmt unter besonderer Berücksichtigung des immunkompetenten Hormons Prolaktin (PRL) als potentieller Vermittler zwischen zentralnervösen und peripher-immunologischen Vorgängen.

Dazu wurde in einer doppelblinden, randomisierten, placebokontrollierten Cross-over-Studie eine Gruppe von 40 jungen, gesunden, männlichen Freiwilligen untersucht. Sie erhielten in einwöchigem Abstand eine einmalige Dosis von 15 mg dex-Fenfluramin (Isomeride<sup>®</sup>), einem zentral wirksamen 5-HT-Releaser / Reuptakeinhibitor, bzw. Placebo verabreicht. In regelmäßigem Abstand wurden Blutproben entnommen und darin die Gesamtleukozyten, Neutrophilen, Eosinophilen, Basophilen, Monozyten, Lymphozyten, B-Zellen, T-Zellen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Zellen mittels FAC-Scan bestimmt. Zu den gleichen Messzeitpunkten wurde als endokriner Parameter Prolaktin im Serum sowie Cortisol im Speichel bestimmt, beide mittels RIA-Verfahren.

Es sollte gezeigt werden, dass die bisher nur mit höheren d-Fen Dosierungen erzielte serotonerge Stimulation auch unter der geringen Dosis von nur 15 mg zu einem Anstieg der PRL-Level führt, um die sonst einhergehenden Nebenwirkungen zu vermeiden. Denn diese könnten ihrerseits als immunologische Störgrößen auftreten.

Im Ergebnis konnten wir einen signifikanten PRL-Anstieg ( $p < 0,001$ ) durch dex-Fenfluramin versus Placebo erreichen. Es kam zu keiner signifikanten Veränderung der Cortisolwerte im gleichen Zeitraum, was einen sensitiveren Mechanismus der PRL-Freisetzung im Gegensatz zur Cortisolfreisetzung aufzeigte.

Die serotonerge Stimulation führte zu einem signifikanten Anstieg der absoluten Zahlen der Eosinophilen und Monozyten ( $p < 0,05$ ) versus Placebo, in der Gruppe der Lymphozyten incl. der Subpopulationen kam es zu keinen signifikanten Veränderungen. Bezogen auf die gesamte Leukozytenpopulation stellte sich eine signifikante Steigerung des prozentualen Anteils der Monozyten ein, für die Gruppe der Eosinophilen und Lymphozyten waren Tendenzen einer Zunahme zu erkennen.

Durch die erfolgreiche Vermeidung eines Cortisolanstiegs konnte eine mögliche Vermittlung von Seiten der HHN-Achse ausgeschlossen werden. Die Überprüfung eines Zusammenhangs der PRL-Veränderungen und der Immunzellveränderungen wurde mit Hilfe der Pearson-Korrelation überprüft. Es konnten keine Zusammenhänge zwischen den signifikant angestiegenen PRL-Werten und den signifikant ver-

änderten Immunzellen gezeigt werden, die Ereignisse sind somit als unabhängig zu betrachten. Die Betrachtung der Korrelationen als Punktwolke gibt jedoch Hinweise auf das Vorhandensein einer Schwellenkonzentration von PRL die überschritten werden muss um immunologische Auswirkungen bewirken zu können.

Da serotonerge Stimulationen auch mit der Änderung weiterer Neuropeptide, Transmitter und Zytokine einhergehen können, wird in der Diskussion deren möglicher zusätzlicher Einfluss auf unser Studienergebnis ausführlich erörtert. Daneben wird versucht, molekulare, rezeptorassoziierte Mechanismen des dex-Fenfluramin induzierten PRL-Anstiegs herauszuarbeiten. Das serotonerge System und PRL mit seinen weitreichenden Einflüssen auf das Immunsystem werden im Theorieteil der Arbeit abgehandelt.

Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass auch niedrige Dosen dex-Fenfluramin eine PRL-Stimulation ermöglichen unter gleichzeitiger Vermeidung eines Cortisolanstiegs. Die serotonerge Stimulation führte so zu Änderungen in den zirkulierenden Monozyten und den granulozytären Zellen, wohingegen die Lymphozyten unbeeinflusst blieben. Da PRL nur ein möglicher Vermittler in zwischen ZNS und IS ist, sollten zukünftige Studien weitere potentielle Kandidaten mit berücksichtigen, bzw. durch den Einsatz spezifischer 5-HT-Rezeptoragonisten / antagonisten der Frage der Rezeptorvermittlung weiter nachgehen. Auch sollten die NK-Zellen in künftigen Studien mit berücksichtigt werden, um ein vollständiges Bild der zellulären Situation zu erhalten.

Die niedrige d-Fen Dosierung ermöglichte uns zu zeigen, dass auch bei Dosen, die dem physiologischen Bereich näher liegen als die sonstigen Provokationsstudien, noch Effekte nachweisbar sind. So können unterschiedliche serotonerge Aktivierungszustände, wie sie beispielsweise im Zusammenhang mit Depression, impulsivem Verhalten oder Autoaggression auftreten, in ihren Auswirkungen auf endokrine und immunologische Modulationen besser erklärt werden. Auch bei deren medikamentöser Behandlung mit zentral wirksamen Substanzen sollten die endokrinen und immunologischen Auswirkungen durch die Vielfältigen dargestellten Interaktionen berücksichtigt werden.

Die Existenz einer Schwellendosis ab der PRL in vivo Auswirkung auf das zelluläre Immunsystem zeigt sollte in einem weiteren Versuchsdesign mit ansteigenden PRL-Serumwerten überprüft werden.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abbas A.K., Lichtmann A.H. & Pober J.S. (1996). *Immunologie*. Bern: Hans Huber Verlag, pp. 25-43
- Aghajanian G.K., Sprouse J.S., Sheldon P. & Rasmussen K. (1990). Electrophysiology of the central serotonin system: Receptor subtypes and transducer mechanisms. In: Whitaker-Azmitia P.M. & Peroutka S.J.: *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 600. *The neuropharmacology of serotonin*, New York: New York Academy of Sciences, pp.93-103
- Akerman S.N., Zorec R., Cheek T.R. (1991). Fura-2 imaging of TRH and dopamine effects on calcium homeostasis of bovine lactotrophs. *Endocrinology*, 129:475-165
- Ammer M., Appel W., Bach G.L. et al. (Eds.) (1995). *Medizinische Tabellen*. Landshut: Bosch-Druck, p.44
- Andersson B, Zimmermann ME, Hedner T & Bjorntorp P (1991). Haemodynamic, metabolic and endocrine effects of short-term dexfenfluramine treatment in young, obese women. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 40(3):249-254
- Andrade R. (1998). Regulation of membrane excitability in the central nervous system by serotonin receptor subtypes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol.861: *Advances in serotonin receptor research*, New York: New York Academy of Sciences, pp.190-203
- Anisman H., Baines M., Berczi I. et al. (1996). Neuroimmune mechanisms in health and disease: 1. Health. *The Canadian Medical Association Journal*, 155(7):867-874
- Arden K.C., Boutin J.M., Kelly P.A., Djiane J. & Cavenee W.K. (1990). The receptors for prolactin and growth hormone are localized in the same region of chromosome 5. *Cytogenetic & Cell Genetic* 53:161-166
- Aune T.M., Golden H.W. & Mc Grath K.M. (1994). Inhibitors of serotonin synthesis and antagonists of serotonin 1A receptors inhibit T lymphocyte function in vitro and cell mediated immunity in vivo. *Journal of Immunology*, 153:489-498
- Aune T.M., McGrath K.M., Sarr T., Bombara M.P. & Kelley K.A. (1993). Expression of 5-HT<sub>1A</sub> receptors on activated human T cells: regulation of cAMP levels and T cell proliferation by 5-HT. *Journal of Immunology*, 151:1175-1183
- Azmitia E.C. & Whitaker-Azmitia P.M. (1991). Awakening the sleeping giant: anatomy and plasticity of the brain serotonergic system. *Journal of Clinical Psychiatry*, 52(12,Suppl.):4-16
- Bagdy G, Calogero AE, Szemerédi K, Gomez MT, Murphy DL, Chrousos GP & Gold PW (1990). Beta-endorphin responses to different serotonin agonists: involvement of corticotropin-releasing hormone, vasopressin and direct pituitary action: *Brain Research*, 537(1-2):227-232
- Bundschuh G., Schneeweiss B. & Bräuer H. (1988). *Biotest – Lexikon der Immunologie*. Berlin: Akademie Verlag

- Battistella PA, Bordin A, Cernetti R, Broetto S, Corra S, Piva E & Plebani M (1996). Beta-endorphin in plasma and monocytes in juvenile headache: *Headache*; 36(2):91-94
- Baumgarten H.G. & Grozdanovic Z. (1995). Psychopharmacology of central serotonergic systems. *Pharmacopsychiatry*, 28(Suppl.): 73-79
- Bazan J.F. (1990). Haematopoietic receptors and helical cytokines. *Immunology Today*; 11:350-354.
- Benkert O., Wetzell H., Szegedi A. (1993). Serotonin dysfunction syndroms: a functional common denominator for classification of depression, anxiety and obsessiv-compulsive disorder. *International Clinical Psychopharmacology*, 8[Suppl.1]:3-14
- Benschop, R.J., Nieuwenhuis, E.E., Tromp, E.A., Godaert, G.L., Ballieux, R.E. & van Doornen, L.J. (1994). Effects of beta-adrenergic blockade on immunologic and cardiovascular changes induced by mental stress. *Circulation* 89 (2): pp.762-769.
- Berendsen H.H.G. (1991). *Behavioural consequences of selective activation of 5-HT receptor subtypes*, Departement of CNS Pharmacology of Organon International B.V. Oss, Netherlands
- Bernini G.P., Argenio G.F., Del Corso C. & Franchi F. (1992). Serotonergic receptor activation by dextrofenfluramin enhances the blunted pituitary-adrenal responsiveness to CRH in obese subjects. *Metabolism*, 41:17-21
- Bernton E., Bryant H., Holaday J. & Dave J. (1992). Prolactin and prolactin secretagogues reverses immunosuppression in mice treated with cysteamine, glucocorticoids, or cyclosporin A. *Brain, Behavior, and Immunity*, 6:394-408
- Bernton E.W., Bryant H.U., Holaday J.W. (1991). Prolactin and immune function. In: *Psychoneuroimmunology, second edition*,. London, New York, Tokyo: Academic Press, Inc., pp.403-428
- Besedovsky O.H., Del Rey A. (1996). Immune-neuroendocrine interaction: Facts and hypothesis. *Endocrine Reviews*, 17:64-102
- Biosource International (1999). Cytokine production in activated leukocytes. *Poster*. Technical and Customer Support, Camarillo, USA
- Blae K. (1998). Kein Anstieg von Herzklappen-Schäden durch Appetitzügler. *Deutsches Ärzteblatt* 95,37:26
- Blalock J.E. (1990). A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiological Reviews*, 69:1-32
- Blier P., Piñeyro G., Dennis T. & de Montigny C. (1993). Electrophysiology of central serotonin neurotransmission. In: P.M. Vanhoutte, P.R. Saxena, R.Paoletti, N. Brunello & A.S. Jackson: *Serotonin, from cell biology to pharmacology and therapeutics*. Milan, Houston: Kluwer Academic Publishers, pp. 55-63
- Bockaert J., Claeysen S., Sebben M. & Dumuis A. (1998). 5-HT<sub>4</sub> Receptors: Gene, transduction and effects on olfactory memory. *Annals of the New York Academy of Sciences. Vol.861: Advances in serotonin receptor research*, New York: New York Academy of Sciences, pp.1-15
- Bond A.J., Feizollah S. & Lader M.H. (1995). The effects of d-fenfluramin on mood and performance, and on neuroendocrine indicators of 5-HT function. *Journal of Psychopharmacology*,9(1):1-8
- Bowker R.M., Westlund K.N., Sullivan M.C. & Coulter J.D. (1982). Organization of descending serotonergic projections to the spinal cord. *Progress in Brain Research*, 57:239-265

- Bronstein DM & Akil H (1990). In vitro release of hypothalamic beta-endorphin (beta E) by arginine vasopressin, corticotropin-releasing hormone and 5-hydroxytryptamine: evidence for release of opioid active and inactive beta E forms. *Neuropeptides*, 16(1):33-40
- Bruhn H.D. (1999). *Lehrbuch der Labormedizin: Grundlagen, Diagnostik, Klinik, Pathobiochemie*. Stuttgart, New York: Schattauer Verlag, p.160
- Burmester G., & Pezzutto A. (1998). *Taschenatlas der Immunologie, Grundlagen, Labor, Klinik*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag,
- Carrier M., Wild J., Pelletier C. & Copeland J.C. (1990). Bromocriptine as an adjuvant to cyclosporine immunosuppression after heart transplantation. *Annales of Thoracic Surgery*, 49:129-132
- Castilla-Cortazar I, Castilla A & Gurpegui M (1998). Opioid peptides and immunodysfunction in patients with major depression and anxiety disorders. *Journal of Physiology and Biochemistry*;54(4):203-215
- Cecilia Fornari M, Fernanda Palacios M, Diez RA, Intebi AD (1994). Decreased chemotaxis of neutrophils in acromegaly and hyperprolactinemia *European Journal of Endocrinology*, 130(5):463-468
- Cessano A., Oberholzner E., Contarini M., (1994). Independent and synergetic effect of interleukin-2 and prolactin on development of T- and NK-derived LAK effectors. *Immunopharmacology*, 28:67-75
- Chaido MA, Idoia GV & Devoino LV (1993). The serotonin-dependent suppression of the immune response by kappa-opiate receptors. *Biulleten Eksperimentalnoi Biologii Meditsiny*, 116(9):291-292
- Chiu S., Koos R.D. Wise P.M. (1992). Detection of prolactin receptor m-RNA in the rat hypothalamus and pituitary gland. *Endocrinology*, 120:1201-1211
- Claeysen S., Faye P., Sebben M., Bockaert J. & Dumuis A. (1998). 5-HT<sub>4</sub> Receptors: Cloning and expression of new splice variants. *Annals of the New York Academy of Sciences. Vol.861: Advances in serotonin receptor research*, New York: New York Academy of Sciences, pp.49-56
- Clancy J., Fillion G., Hellstrand K. & Lorens S.A. (1993). Interactions between serotonin and the immune system: An overview. In: P.M. Vanhoutte, P.R. Saxena, R.Paoletti, N. Brunello & A.S. Jackson: *Serotonin, from cell biology to pharmacology and therapeutics*. Milan, Houston: Kluwer Academic Publishers, pp.353-357
- Cleare A.J., Murray R.M. & O'Keane V. (1996). Reduced prolactin and cortisol responses to d-fenfluramin in depressed compared to healthy matched control subjects. *Neuropharmacology* 14(5):349-354
- Clevenger C.V., Freier D.O. & Kline J.B (1998). Prolactin receptor signal transduction in cells of the immune system. *Journal of Endocrinology*, 157:187-197
- Coccaro E.F., Berman M.E., Kavoussi R.J. & Hauger R.L. (1996a). Relationship of prolactin response to dex-fenfluramin to behavioral and questionnaire assessments of aggression in personality disordered men. *Biological Psychiatry*, 40:157-164
- Coccaro E.F., Gabriel S., Mahon T., Macaluso J. & Siever L.J. (1992). Effect of buspirone on prolactin secretion is not mediated by 5-HT<sub>1A</sub> stimulation (in reply). *Archives of General Psychiatry*, 49(2):163-164
- Coccaro E.F., Kavoussi R.J., Oakes M., Cooper T.B. & Hauger R. (1996b). 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor blockade by amesergide fully attenuates prolactin response to d-fenfluramine challenge in physically healthy human subjects. *Psychopharmacology*, 126:24-30

- Colditz I., Kerlin R. & Watson D. (1988). Migration of neutrophils and their role in elaboration of host defense. In: Husband A.J. (Edt.): *Migration and homing of lymphoid cells, Volume I & II*. Boca Raton: CRC Press, Inc., pp.135-157
- Connolly H.C., Crary J.L., McGoon M.D. (1997). Valvular heart disease associated with fenfluramin-phenteramin. *New England Journal of Medicine*, 337:581-588
- Connor TJ, Kelly JP & Leonard BE (2000). An assessment of the acute effects of the serotonin releasers methylenedioxyamphetamine, methylenedioxyamphetamine and fenfluramine on immunity in rats. *Immunopharmacology*, 46(3):223-235
- Cowen P.J., Anderson I.M. & Gartside S.E. (1990). Endocrinological responses to 5-HT. In: Whitaker-Azmitia P.M. & Peroutka S.J.: *Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 600. The neuropharmacology of serotonin*, New York: New York Academy of Sciences, pp.250-259
- Crosignani J.G., Lombroso G.C., Mattei A., Caccamo A. & Trojsi L. (1979). Effect of three serotonin antagonists on plasma prolactin response to suckling puerperal women. *Journal of Endocrinology and Metabolism*, 48:335-337
- Curzon G., Gibson E.L., Kennedy A.J. & Oluyomi A.O. (1993). Serotonergic pharmacology of appetite. In: P.M. Vanhoutte, P.R. Saxena, R.Paoletti, N. Brunello & A.S. Jackson: *Serotonin, from cell biology to pharmacology and therapeutics*. Milan, Houston: Kluwer Academic Publishers, pp.393-397
- Czarnetzki, B.M. (1992). Eosinophil chemotactic factors. In: Roitt I.M. & Delves P.J. (Eds.). *Encyclopedia of immunology*. London, New York, Tokyo: Academic Press, pp. 510-512
- Dardenne M. & Savino W. (1994). Prolactin-mediated cellular interaction in the thymus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 741:100-107
- Dardenne M., Carmo Leite de Moraes M., Kelly P.A. & Gagernault M.-C. (1994). Prolactin receptor expression in human hematopoietic tissues analyzed by flow cytometry. *Endocrinology*, 134:2108-2114
- Das R. & Vonderhaar B.K. (1995). Transduction of prolactin's (PRL) growth signal through both long and short forms of the PRL receptor. *Molecular Endocrinology*, 9:1750-1759
- Davila D.R., Brief S., Simon J., Hammer J. & Kelley K.W. (1987). Role of growth hormone in regulating T-dependent immune events in aged, nude and transgenic rodents. *Journal of Neuroscience Research*, 18: 108-116
- De Witte P (1996). The role of neurotransmitters in alcohol dependence: animal research. *Alcohol and Alcoholism. Suppl 1*:13-16
- DeGroot L.J., Cahill G.F., Odell W.D. (1979). Prolactin. In: *Endocrinology Volume 1*, New York: Grune & Stratton, pp.191-196
- Demarest K.T., Riegler G.D. & Moore K.E. (1985). The interrelationship between the rapid „tonic“ and the delayed „induction“ components of the prolactin-induced activation of tuberoinfundibular dopaminergic neurons. In: MacLeod R.M., Scapagnini U. & Thorner M.O.: *Prolactin-basic and clinical correlates*. New York: Springer-Verlag, pp.533-542
- Devoino L., Morozova N., & Cheido M. (1988). Participation of serotonergic system in neuroimmunomodulation: intrainmune mechanisms and pathways providing an inhibitory effect. *International Journal of Neurosciences*, 40: 111-128

- Di Sciuillo A, Bluet-Pajot MT, Mounier F, Oliver C, Schmidt B & Kordon C (1990). Changes in anterior pituitary hormone levels after serotonin 1A receptor stimulation. *Endocrinology*, 127(2):567-572
- Doppler W. (1994). Regulation of gene expression by prolactin. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*;124:93-130
- Draca S. (1995). Prolactin as an immunoreactive agent. *Immunology and Cell Biology*,73:481-483
- Ewe K. & Karbach U. (1990). Funktionen des Magen-Darm-Kanals. In: Schmidt R.F., Thews G.: *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, pp. 733-735
- Fan T, Li J & Kong T (1993). Relationship between acupuncture analgesia and neurotransmitters in nucleus raphe magnus. *Chen Tzu Yen Chiu*, 18(3): 168-171
- Felten D.L., Felten S.Y., Bellinger D.L., Carlson S.L., Ackermann K.D., Madden K.S., Olschowski J.A. (1987). Noradrenergic symphathetic neural interactions with the immune system: Structure and function. *Immunological Reviews*, 100:225-260
- Ferrag F., Lebrun J-J., Touraine P. (1994). Prolactin and the immune system. *Immunomethods*, 5:21-30
- Ferrari C. (1981). Syntheses, release and biological action of human prolactin. In: Fotherby K., Pal S.B.: *Hormones in normal and abnormal human tissues*, New York: De Gruyter; pp.281-326
- Fillion M.P., Prudhomme N., Haour F., Fillion G., Bonnet M. & Launay J.M. (1989). Hypothetical role of the serotonergic system in neuroimmunomodulation: Preliminary molecular studies. In: Hadden J.W., Mašek K. & Nisticò G.: *Interactions among CNS, Neuroendocrine and Immune systems*, Rome-Milan: Pythagora Press, pp.235-250
- Fillon G., Fillon M.-P., Cloez-Tayarani I., Sarhan H., Haour F. & Bolanos F. (1993). 5-HT and immune system. In: P.M. Vanhoutte, P.R. Saxena, R.Paoletti, N. Brunello & A.S. Jackson: *Serotonin, from cell biology to pharmacology and therapeutics*. Milan, Houston: Kluwer Academic Publishers, pp.329-335
- Fornari M.C., Palacios M.F., Roberto A.D. & Intebi A.D. (1994). Decreased chemotaxis of neutrophils in acromegaly and hyperprolactinemia. *European Journal of Endocrinology* 130:463-468
- Frantz A.G. (1978). Prolactin. *New England Journal of Medicine*, 298:201-207
- Frick H., Leonhardt H., Stark D. (1987). *Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie. Band 2: Spezielle Anatomie II, Eingeweide-Nervensystem-Systematik der Muskeln und Leitungsbahnen*. Stuttgart, New York: Thieme Verlag
- Friesen H.G., Gerther A., Walker A. & Elsholtz H. (1985). Mechanism of action of prolactin in stimulating cell growth. In: MacLeod R.M., Scapagnini U. & Thorner M.O. (1985). *Prolactin-basic and clinical correlates*. New York: Springer-Verlag, pp.315-326
- Gala R.R. (1991). Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 198(1):513-527
- Gebrauchsinformation der Firma Itherapia GmbH, (Westendstr.70, 80686 München) über ISOMERIDE®. In: Fachinfoservice Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V.: Stand der Information: November 1994

- Gellerson B., Kempf R., Telgmann R. (1994). Non-pituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Molecular Endocrinology*, 8:356-373
- Gerli R., Rambotti P., Nicoletti I. & Orlandi S. (1986). Reduced number of natural killer cells in patients with pathological hyperprolactinemia. *Clinical and Experimental Immunology*, 64:399-406
- Giglio T, Imro MA, Filaci G, Scudeletti M, Puppo F, De Cecco L, Indiveri F, Costantini S (1994). Immune cell circulating subsets are affected by gonadal function. *Life Sciences*, 54(18):1305-1312
- Gimble J. M., Thompson L.F & Kincade P.W. (1992). B Lymphocytes. In: Roitt I.M. & Delves P.J. (Eds.). *Encyclopedia of Immunology*. London, New York, Tokyo: Academic Press, pp. 242-244
- Goffin V., Bouchard B., Ormandy C.J. (1998). Prolactin: A hormon at the cross-roads of neuroimmunoendocrinology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840:498-509
- Gonzalez-Heydrich J. & Peroutka S.J. (1990). Serotonin receptor and reuptake sites: pharmacologic significance. *Journal of Clinical Psychiatry*, 51(4,Suppl.): 5-12
- Goodwin G.M., Murray C.L. & Bancroft J. (1994). Oral d-fenfluramine and neuroendocrine challenge: problems with the 30 mg dose in men. *Journal of Affective Disorders* 30:117-122
- Göthert M. (1990). Presynaptic serotonin receptors in the central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 604:102-112
- Graham D.J. & Green L. (1997). Further cases of valvular heart disease associated with fenfluramine-phenteramine. *New England Journal of Medicine*, 337:635-636
- Grimaldi B., Sibella-Arguelles C., Bonnin A., Fillinon M.P., Massot O., Rousselle J.C. & Fillon G. (1998). Functional properties of 5-HT-Moduline in the immune system: A model for central nervous system investigation. *Annals of the New York Academy of Sciences. Vol.861: Advances in serotonin receptor research*, New York: New York Academy of Sciences, pp. 249-250
- Gupta S., Fikrig S.M. & Noval M.S. (1983). Immunological studies in patients with isolated growth hormone deficiency. *Clinical and Experimental Immunology*, 54:87-90
- Hamblin M.W., Guthrie C.R., Kohen R. & Heidmann D.E. (1998). Gs protein-coupled serotonin receptors: receptor isoforms and functional differences. *Annals of the New York Academy of Sciences. Vol.861: Advances in serotonin receptor research*, New York: New York Academy of Sciences, pp.31-37
- Hartmann D.P., Holaday J.W. & Brenton E.W. (1989). Inhibition of lymphocyte proliferation by antibodies to prolactin. *FASEB Journal*, 3:2194-2202
- Harvath L. (1992). Motility of immune cells. In: Roitt I.M. & Delves P.J. (Eds.). *Encyclopedia of Immunology*. London, New York, Tokyo: Academic Press, pp. 1097-1100
- Haus, E. (1994). Chronobiology of circulating blood cells and platelets. In: Y.Touitou & E.Haus (Eds.) *Biologic rhythms in clinical and laboratory medicine*, Heidelberg: Springer-Verlag, pp.504- 526.

- Heidmann D.E.A., Metcalf M.A., Kohen R. & Hamblin M.W. (1997). Four 5-hydroxytryptamine<sub>7</sub> (5-HT<sub>7</sub>) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: Species differences due to altered intron-exon organisation. *Journal of Neurochemistry*, 68:1372-1381
- Hellstrand K. & Hermodson S. (1987). Role of serotonin in the regulation of human natural killer cell cytotoxicity. *The Journal of Immunology*, 139:869-875
- Hellstrand K. & Hermodsson A. (1993). Serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> receptors regulate a cell-contact-mediated interaction between monocytes and natural killer cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 37:7-18
- Hellstrand K., Dahlgren C. & Hermodsson A. (1993). Serotonergic regulation of natural killer cells: A minireview. In: P.M. Vanhoutte, P.R. Saxena, R.Paoletti, N. Brunello & A.S. Jackson: *Serotonin, from cell biology to pharmacology and therapeutics*. Milan, Houston: Kluwer Academic Publishers, pp.345-351
- Hennig J., Becker H., Netter P. (1996). 5-HT agonist-induced changes in peripheral immune cells in healthy volunteers: The impact of personality. *Behavioural Brain Research*, 73(1-2):359-363
- Hennig J., Laschefski U., Becker H., Rammsayer T. & Netter P. (1993). Immune cell and cortisol responses to physically and pharmacologically induced lowering of body core temperature. *Neuropsychobiology* 28:82-86
- Hickson R.C. & Boone J.B. (1991). Physical exercise and immunity. In: Plotnikoff N., Murgu A., Faith R. & Wybran J. (Eds.): *Stress and Immunity*. London: CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, pp.211-234
- Hiestand P.C., Mekler P., Nordmann R. & Permmongkol C. (1986). Prolactin as a modulator of lymphocyte responsiveness provides a possible mechanism of action for cyclosporin. *Proceedings. National Academy of Sciences (USA)*, 83:2599-2603
- Holaday J.W., Gilbeau P.M., Smith C.G. & Pennington L.L. (1984). Multiple opioid receptors in the regulation of neuroendocrine response in the conscious rat and monkey. In: G.Delitala, M.Motta & M. Serio: *Opioid modulation of endocrine function*, New York: Raven, pp.21-32
- Hollander E., DeCaria C.M., Nitescu A., Gully R., Suckow R.F., Cooper T.B., Gorman J.M., Klein D.F., Liebowitz M.R. (1992). *Archives of General Psychiatry* 49(1):21-28
- Hondo E., Kurohmaru M., Sakai S., Ogawa K. & Hayashi Y. (1995). Prolactin receptor expression in rat spermatogenic cells. *Biology of Reproduction*, 52:1284-1290
- Hoyer D., Clarke D., Fozard J.R., Hartig P.R., Martin G.R. & Humphrey P. (1994). VII. International union of pharmacology classification of receptors for 5-Hydroxytryptamin (serotonin). *Pharmacological Reviews*, 46(2):157-198
- Humphrey P.A., Hartig P. & Hoyer D. (1993). A reappraisal of 5-HT receptor classification. In: P.M. Vanhoutte, P.R. Saxena, R.Paoletti, N. Brunello & A.S. Jackson: *Serotonin, from cell biology to pharmacology and therapeutics*. Milan, Houston: Kluwer Academic Publishers, pp.41-47
- Humphreys M.S., Revelle W., Simon L. & Gilliland K. (1980). Individual differences in diurnal rhythms and multiple activation states: A reply to M.W. Eysenk and Folkard. *Journal of Experimental Psychology. General*, 109(1):42-48
- Israel J.M., Kukstas L.A., Vincent S. (1990). Plateau potential recorded from lactating rat enriched lactotroph cells are triggered by TRH and shortened by dopamine. *Neuroendocrinology*, 51:113-122

- Jabbour H.N., Kelly P.A. (1997). Prolactin receptor subtypes: a possible mode of tissue specific regulation of prolactin function. *Reviews of Reproduction*, 2:14-18
- Jackson J.C., Cross R.J., Walker R.F., Markesbery W.R., Brooks W.H. & Roszman T.L. (1985). Influence of serotonin on the immune response. *Immunology*, 54:505
- Jacobs B.L. & Azmitia E.C. (1992). Structure and function of the brain serotonergic systems. *Physiological Review* 72:165-229
- Janeway C.A. & Travers P. (1997). Gezielte Beeinflussung der Immunantwort. In: Charles A. Janeway und Paul Travers *Immunologie* 2.Auflage, Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag
- Kahle W. (1986)<sup>5</sup>. Bd.3. Nervensystem und Sinnesorgane. In: Kahle W., Leonhardt H., Platzer W.: *Taschenatlas der Anatomie: für Studium und Praxis*, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, pp.190-191
- Karlson P., Doenecke D., Koolman J. (1994)<sup>14</sup>. *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Stuttgart, New York: Thieme Verlag, pp.417-463
- Karow T., Lang R. (1996). Psychopharmaka. In: *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Köln pp.296-318
- Katznelson L. & Klibanski A. (1995). Prolactin and its disorders. In: Becker K.L. *Principals and practice of endocrinology and metabolism, second edition*, Philadelphia: J. B. Lippincott Company, pp. 140-147
- Kelland M.D. & Chiodo L.A. (1996). Serotonergic modulation of midbrain dopaminergic systems. In: Ashby Jr. (Ed.). *The modulation of dopaminergic neurotransmission by other neurotransmitters*. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press, pp.87-122
- Kelley K.W., Arkins S. & Ming Li Y. (1992a). Growth hormone, prolactin, and insulin-like growth factors: New jobs for old players. *Brain, Behavior, and Immunity*, 6:317-326
- Kelly P.A., Djiane J., Ederly M. (1992b). Different forms of the prolactin receptor. Insights into the mechanisms of prolactin action. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 3:54-59
- Kelly P.A., Djian J., Postel-Vinay M.C. & Ederly M. (1991). The prolactin / growth hormone receptor family. *Endocrine Reviews*, 12(3):235-251
- Khan I.A., Bhardwaj G., Malla N., Wattal C. & Agarwal (1986). Effect of serotonin on T-lymphocyte proliferation in vitro in healthy individuals. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*., 81:378-380
- Kho HG, van Egmond J, Zhuang CF, Zhang GL, Lin GF (1990). The patterns of stress response in patients undergoing thyroid surgery under acupuncture anaesthesia in China. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 34(7):563-71
- Kiecolt-Glaser J.K., Garner W., Speicher C., Penn G.M., Holladay J. & Glaser R. (1984). Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students. *Psychosomatic Medicine* 46:7-14
- Kiess W., Belohradsky B.H. (1986). Endocrine regulation of the immune system. *Klinische Wochenschrift*, 64:1-7
- Kiess W., Hall N. (1989). Hormone im Immunsystem. In: Hesch R.D.: *Endokrinologie Teil A Grundlagen*, Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, pp. 346-360

- Kirschbaum D., Strasburger C.J., Jammers W. & Hellhammer D. (1989). Cortisol and behaviour: 1. Adaption of a radioimmunoassay kit for reliable and inexpensive salivary cortisol determination. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 34:747-751
- Kleinberger D.L., Noel G.L. & Frantz A. (1977). Galactorrhea: A study of 235 cases, including 48 with pituitary tumor. *New England Journal of Medicine*; 296:589
- Klokke M, Secher NH, Madsen P, Olesen HL, Matzen S, Knigge U, Warberg J & Pedersen BK (1997). Influence of Naloxone on the cellular immune response to head-up tilt in humans. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*,76(5):415-420
- Knapp M.S. (1992). Rhythmicity in immunity and in factors influencing immune response. In: Alan J. Husband (Ed.): *Behaviour and Immunity*. Boca Raton, Ann Arbor, London: CRC-Press, pp.109-125
- Koike K., Masumoto N., Kasahara K. (1991). Tumor necrosis factor alpha stimulates prolactin release from anterior pituitary cells. *Endocrinology*, 128:2785-2790
- Köller M., Kotzmann h., Clodi M., Riedl M. & Luger A. (1997). Effects of elevated serum prolactin concentrations on the immunophenotype of human lymphocytes, mitogen-induced proliferation and phagocytic activity of polymorphonuclear cells. *European Journal of Clinical Investigations*. 27(8):662-666
- Kovalovsky D, Pereda MP, Stalla GK, Holsboer F & Arzt E (1999). Differential regulation of interleukin-1 receptor antagonist by proopiomelanocortin peptides adrenocorticotrophic hormone and beta-endorphin: *Neuroimmunomodulation*, 6(5):367-372
- Kowalski J (1997). Effect of enkephalins and endorphins on cytotoxic activity of natural killer cells and macrophages/monocytes in mice. *European Journal of Pharmacology*, 326(2-3):251-255
- Kreutzig T. (1993)<sup>7</sup>. *Biochemie*. Neckarsulm, Stuttgart: Jungjohann Verlag, pp.263-264
- Kroeze W.K., Roth B.L. (1998). The molecular biology of serotonin receptors: therapeutic implications for the interface of mood and psychosis. *Biological Psychiatry*, 44(11):1128-1142
- Kubota K, Kurabayashi H, Take H, Tamura K, Shirakura T (1997). Effects of repeated hyperthermal stress on blood cells in vivo. *Journal of Medicine*, 28(1-2):55-61
- Kuschinsky G., Lüllmann H. (1989)<sup>12</sup>. *Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart, New York: Thieme Verlag, pp.123-130
- Lahat N., Miller A., Shtiller R. & Touby E. (1993). Differential effects of prolactin upon activation and differentiation of human B-lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 47:35-40
- Larson D.F., Copland J.G., Russel D.H. (1985). Prolactin predicts cardiac allograft rejection in cyclosporin immunosuppressed patients. *Lancet*, 2:53
- Leite de Moraes M.C., Touraine P., Gagnerault M.C. (1995). Prolactin receptors and the immune system. *Annales d'Endocrinologie*, 56:567-570
- Leonard B.E. (1992). Sub-types of serotonin receptors: biochemical changes and pharmacological consequences. *International Clinical Psychopharmacology*, 7:13-21

- Lesch K.P., Rupprecht R., Poten B., Müller U., Söhnle., Fritze J., & Schulte H.M. (1989). Endocrine responses to 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation by ipsapiron in humans. *Biological Psychiatry*, 26:203-205
- Levenson T, Greenberger PA (1996). Immunologic effects of intranasal corticosteroids. *Allergy and Asthma Proceedings*, 17(3):157-159
- Levy A.D. & Van de Kar L.D. (1992). Endocrine and receptor pharmacology of serotonergic anxiolytics, antipsychotics and antidepressants. *Life Sciences*, 51:83-94
- Lewis U.J., Singh R.N., Sina Y.N., Vanderlaan W.P (1985). Glycosylated human prolactin. *Endocrinology*; 116:359
- Lieb K, Fiebich BL, Busse-Grawitz M, Hull M, Berger M & Bauer (1996). Effects of substance P and selected other neuropeptides on the synthesis of interleukin-1 beta and interleukin-6 in human monocytes: a re-examination. *Journal of Neuroimmunology*, 67(2):77-81
- Lorens S.A., Petrovic L., Hejna G., Dong X.W. & Clancy J. (1993). The stimulatory effects of d-fenfluramine (d-FEN) on blood and splenic immune functions in the Fischer 344 rat are age and sex dependent. In: P.M. Vanhoutte, P.R. Saxena, R.Paoletti, N. Brunello & A.S. Jackson: *Serotonin, from cell biology to pharmacology and therapeutics*. Milan, Houston: Kluwer Academic Publishers, pp.337-343
- Lucey L.V., Butcher G., Clare A.W. & Dinan T.G. (1992). Buspirone induced prolactin responses in obsessive-compulsive disorder (OCD): is OCD a 5-HT<sub>2</sub> receptor disorder? *International Clinical Psychopharmacology*, 7:45-49
- MacLeod R.M., Scapagnini U. & Thorner M.O. (1985). *Prolactin-basic and clinical correlates*. New York: Springer-Verlag
- Maes M. (1995). Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 19(1):11-38
- Maes M., Van Gastel A., Ranjan R., Blockx P., Cosyns P., Meltzer H.Y. & Desnyder (1996). Stimulatory effects of L-5-hydroxytryptophan on postdexamethasone beta-endorphin levels in major depression. *Neuropsychopharmacology*, 15(4):340-348
- Maes M., D'Hondt P., Suy E., Minner B., Vandervorst C. & Raus J. (1991). HPA-axis hormones and prolactin responses to dextro-fenfluramine in depressed patients and healthy controls. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 15:781-790
- Malathi A., Parulkar V.G. (1992). Evaluation of anxiety status in medical students prior to examination stress. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 36(2):121-122
- Male D. (1995). *Immunology – An illustrated outline*. London: Mosby-Wolfe Medical Communications,
- Mark E.J., Patalas E.D., Chang H.T. (1997). Fatal pulmonary hypertension associated with short-term use of fenfluramin and phenteramin. *New England Journal of Medicine*, 337:602-606

- Mašek K., Horák P., Kadlec O & Fliegel M. (1989). The interactions between neuroendocrine and immune systems at the receptors level. The possible role of serotonergic system. In: Hadden J.W., Mašek K. & Nisticò G.: *Interactions among CNS, neuroendocrine and immun systems*, Rome-Milan: Pythagora Press, pp.225-234
- Matera L. (1997). Action of pituitary and lymphocyte prolactin. *Neuroimmunomodulation*, 4:171-180
- Matera L., Bellone G. & Contarini M. (1992). Synthesis of prolactin-like peptid by natural killer cells; positive regulation by CD 16 and exogenous prolactin. *Cellular and Molecular Biology*, 38:915-920
- Materna L., Bellone G., Lebrun J. (1996). Role of prolactin in the in vitro development of interleukin-2-driven anti-tumoral lymphokin-activated killer cells. *Immunology*, 89:619-626
- Mathews HL, Goral J, Yamamura Y, Clancy J & Lorens SA (1998). Effect of d-fenfluramine on the lymphocyte response of HIV+ humans.: *International Journal of Immunopharmacology*, 20(12):751-63
- Mathews HL, Lorens SA & Clancy J Jr (1996). Effect of d-fenfluramine on the local immune response to the opportunistic microbial pathogen *Candida albicans*: *Behavioural Brain Research*, 1996;73(1-2):369-374
- McTavish D. & Heel R.C. (1992). Dexfenfluramin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in obesity. *Drugs*, 43(5):713-733
- Meltzer H.Y. & Maes M. (1995a). Effect of pindolol pretreatment on MK-212-induced plasma cortisol and prolactin responses in normal men. *Biological Psychiatry*, 38:310-318
- Meltzer H.Y. & Maes M. (1995b). Pindolol pretreatment blocks stimulation by meta-chloropromazine of prolactin but not cortisol secretion in normal men. *Psychiatry Research*, 58:89-98
- Meltzer H.Y. (1993). Role of the serotonergic system in pituitary hormone secretion: The pharmacologic challenge paradigm in man. In: P.M. Vanhoutte, P.R. Saxena, R.Paoletti, N. Brunello & A.S. Jackson: *Serotonin, from cell biology to pharmacology and therapeutics*. Milan, Houston: Kluwer Academic Publishers, pp.239-247
- Meltzer H.Y., Lee H.S. & Nash J.F. (1992). Effect of buspirone on prolactin secretion is not mediated by 5-HT<sub>1A</sub> receptor stimulation. *Archives of General Psychiatry*, 49(2):163
- Morant J. (Herausgeber) (1996). *Arzneimittel-Kompendium der Schweiz® 1997*. Basel, Documed AG
- Mossner R. & Lesch K.P. (1998). Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain, Behavior and Immunity*, 12(4):249-271
- Muldoon M.F., Manuck S.B., Jansma C.L., Moore A.L., Perel J., Mann J.J. (1996). D,L-fenfluramine challenge test: experience in nonpatient sample. *Biological Psychiatry* 39(9):761-768
- Müller E.E., Locatelli V., Cella S., Penalva A., Novelli A. & Cocchi D. (1983). Prolactin-lowering and -releasing drugs. Mechanisms of action and therapeutic application. *Drugs*, 25:399-432

- Murphy D.L. (1992). An overview of serotonin neurochemistry and neuroanatomy. In: M. Sandler, A. Coppen & Harnett S.: *5-hydroxytryptamine in psychiatry. A spectrum of ideas*, Oxford, New York, Tokio: Oxford University Press, pp. 23-36
- Murphy D.L., Aulakh C., Mazzola-Pomietto M., Briggs N.C. (1996). Neuroendocrine responses to serotonergic agonists as indices of the functional status of central serotonin neurotransmission in humans: A preliminary comparative analysis of neuroendocrine endpoints versus other endpoints measures. *Behavioural Brain Research*, 73:209-214
- Murphy R.M. & Zemlan F.P. (1992). Quantitativ autoradiographic mapping of a novel serotonin receptor 5-HT<sub>1S</sub>. *Neuroreport*, 3:837-840
- Nagy E., Berczi I. (1991). Hypophysectomised rats depend on residual prolactin for survival. *Endocrinology*, 128:2776-2784
- Netter P., Hennig J. (1997). Die Persönlichkeitsstruktur der PMS-Patientinnen. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 57:M120-M122
- Nicoll C.S. (1980). Ontogeny and evolution of prolactin's function. *Federation Proceedings* 39: 2563-2566
- Nira B.J. (1994). Regulation of prolactin secretion. In: Imura H.: *The pituitary gland, second edition*, New York: Raven Press, Ltd., pp. 261-283
- O'Keane V., Moloney E., O'Neill H., O'Connor A., Smith C. & Dinan T.G. (1992). Blunted prolactin response to d-fenfluramin in sociopathy. Evidence for subsensitivity of central serotonergic function. *British Journal of Psychiatry* 160:643-646
- O'Neal K.D., Montgomery D.W. Truong T.M. (1992). Prolactin gene expression in human thymocytes. *Molecular and Cellular Biology*, 87:19-23
- Ohta H., Kato Y., Shimatsu A., Tojo K., Kabajama Y., Inoue T., Yanaihara N. & Imura H. (1985). Inhibition by antiserum to VIP of prolactin secretion induced by serotonin in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 109:409-412
- Orosco M, Robert JJ, Rouch C, Jacquot C & Cohen Y (1990). Reversal of a feeding-reward system by dexfenfluramine: neurochemical involvement. *Physiology and Behavior*, 48(6):887-892
- Pabst R. & Binns R.M. (1992). Lymphocyte Trafficking. In: Roitt I.M. & Delves P.J. (Eds.). *Encyclopedia of immunology*. London, New York, Tokyo: Academic Press, pp. 1003-1005
- Page R.B. (1992). Neuropharmacology of anterior pituitary control. In: Barrow D.L. & Selman W.R. (Eds.): *Neuroendocrinology, Vol.5: Concepts in neurosurgery*, Baltimore, Hong Kong, London, Sydney: Williams & Wilkins, pp.31-63
- Palazidou E., Stephenson J., Butler J., Coskeranp., Chambers S. & McGregor A.M. (1995). Evidence for 5-HT<sub>1A</sub> receptor involvement in the control of prolactin secretion in man. *Psychopharmacology*, 119:311-314
- Pasnik J, Tchorzewski H, Baj Z, Luciak M & Tchorzewski M (1999). Priming effect of met-enkephalin and beta-endorphin on chemiluminescence, chemotaxis and CD11 molecule expression on human neutrophils in vitro. *Immunology Letters*; 67(2):77-83
- Pasotti D, Mazzone A & Ricevuti G (1992). The nervous system and the immune system: the role of morphine and opioid peptides in the function of neutrophilic granulocytes. *Minerva Medica*, 83(7-8):433-438

- Pasotti D, Mazzone A, Lecchini S, Frigo GM & Ricevuti G (1993). The effect of opioid peptides on peripheral blood granulocytes. *Rivista Europea per le Scienze Mediche et Farmacologiche*, 15(2):71-81
- Pellegrini I., Lebrun J.J., Ali S. & Kelly P.A. (1992). Expression of prolactin and its receptors on human lymphoid cells. *Molecular Endocrinology*, 6:1023-1029
- Peroutka S.J. & Schmidt A.W. (1992). An overview of 5-hydroxytryptamine receptor families. In: M. Sandler, A. Coppen & Harnett S.: *5-hydroxytryptamine in psychiatry. A spectrum of ideas*, Oxford, New York, Tokio: Oxford University Press, pp.2-22
- Peroutka S.J., Schmidt A.W., Sleight A.J. & Harrington M. (1990). Serotonin receptor "families" in the central nervous system: An overview. In: Whitaker-Azmitia P.M. & Peroutka S.J.: *Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 600. The neuropharmacology of serotonin*, New York: New York Academy of Sciences, pp.104-113
- Peter H.H. (1996). Immunmodulation. In: Peter H.H., Pichler W.J.. *Klinische Immunologie*, 2. Auflage, München-Wien-Baltimore, Urban & Schwarzenberg, pp 166-168
- Pichler W.J., Peter H.H. & Hänsch M.G. (1996). Prinzipien des Immunsystems. In: Peter H.H., Pichler W.J.. *Klinische Immunologie*, 2. Auflage, München-Wien-Baltimore, Urban & Schwarzenberg, pp 17-51
- Pijl H, Koppeschaar HP, Willekens FL, Frolich M & Meinders AE (1993). The influence of serotonergic neurotransmission on pituitary hormone release in obese and non-obese females. *Acta Endocrinologica*, 128(4):319-324
- Prystowsky M.B., Clevenger C.V. (1994). Prolactin as a second messenger for interleukin 2. *Immunomethods*, 5:49-55
- Qugley M.E., Robert J.F. & Yen S.S.C. (1981). Acute prolactin release triggered by feeding. *Journal of Endocrinology and Metabolism*, 52(5): 1043-1045
- Racke K., Reimann A., Schworer H., Kilbinger H. (1996). Regulation of 5-HT release from enterochromaffin cells. *Behavioural Brain Research*, 73(1-2): 83-87
- Ravindran AV, Griffiths J, Merali Z, Knott VJ & Anisman H (1999). Influence of acute tryptophan depletion on mood and immune measures in healthy males. *Psychoneuroendocrinology*, 24(1):99-113
- Reber P.M. (1993). Prolactin and immunomodulation. *American Journal of Medicine*, 95:637-644
- Reichlin S. (1998). Alternative pathways of neural control of the immune process. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840:301-316
- Roitt I.M. (1988). Die erworbene Immunantwort. In: Ivan M. Roitt *Leitfaden der Immunologie* 3.Auflage, Darmstadt, Steinkopff Verlag, pp.132-133
- Romagnani S. (1996). TH1 and TH2 in human diseases. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 80:225-235
- Ruß A. (1998)<sup>4</sup>. *Arzneimittel pocket-1999*. Grünwald: Börm Bruckmeier Verlag
- Sacerdote P, Rubboli F, Locatelli L, Ciciliato I, Mantegazza P & Panerai AE (1991). Pharmacological modulation of neuropeptides in peripheral mononuclear cells. *Journal of Neuroimmunology*, 32(1):35-41
- Sagrillo CA & Voogt JL (1992). Mechanisms for the stimulatory effects of

- opioidergic and serotonergic input signals on prolactin in pregnant rats. *Life Sciences*; 50(20):1479-1489
- Sassin J.F., Franz A.G. & Weitzmann E.D. (1972). Human prolactin: 24-hour pattern with increased release during sleep. *Science*, 177:1205-1207
  - Savino W., Villa-Verde D.M., Alves L.A. & Dardenne M. (1998). Neuroendocrine control of the thymus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840:470-479
  - Schattenfroh S. (1997). Drei Appetitzügler vom Markt genommen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 47:11
  - Schedlowski M. (1995). Psychoneuroimmunologie - Nervensystem und Immunsystem im Dialog. *Zeitschrift für Allgemeinmedizin*, 71:1274-1280
  - Schedlowski M., Jacobs R., Strateman G., Richter S., Tewes U. & Schmidt R.E. (1993). Changes in natural killer cells during acute psychological stress. *Journal of Clinical Immunology*, 13:119-126
  - Schürmeyer T.H., Brademann G. & Von zur Mühlen A. (1996). Effect of fenfluramine on episodic ACTH and cortisol secretion. *Clinical Endocrinology*, 45:39-45
  - Silberstein D.S. (1992). Eosinophils. In: Roitt I.M. & Delves P.J. (Eds.). *Encyclopedia of Immunology*. London, New York, Tokyo: Academic Press, pp. 512-514
  - Silver RM, Heyes MP, Maize JC, Quearry B, Vionnet-Fuasset M. & Sternberg EM (1990). Scleroderma, fasciitis, and eosinophilia associated with the ingestion of tryptophan. *New England Journal of Medicine*, 322(13):874-881
  - Sinha Y.N., Depaolo L.V., Haro L.S., Singh R.N., Jacobsen B.P., Scott K.E., Lewis U.J. (1991). Isolation and biochemical properties of four forms of glycosylated porcine prolactin. *Molecular and Cellular Endocrinology*; 80: 203-213
  - Sitzmann F.C. (1986). *Normalwerte*. München: Hans Marseille Verlag, p. 193
  - Sleight A.J. (1998a). 4-Amino-N-(2,6 bis-methylamino-pyrimidin-4-yl)-benzene sulfonamide (Ro 04-6790): potent and selective antagonist at human and rat 5-HT<sub>6</sub>-receptors. *British Journal of Pharmacology*., 124:556-562
  - Sleight A.J., Boess F.G., Bös M. & Bourson A. (1998b). The putative 5-HT<sub>6</sub> Receptor: Localisation and function. *Annals of the New York Academy of Sciences. Vol.861: Advances in serotonin receptor research*, New York: New York Academy of Sciences, pp.91-96
  - Smith P.E. (1930). The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *Anatomical Record*, 47:119-129
  - Sommermeyer H., Schreiber R., Greuel J.M., De Vry J. & Glaser T. (1993). Anxiolytic effects of the 5-HT<sub>1A</sub>-receptor agonist ipsapirone in the rat: neurobiological correlates. *European Journal of Pharmacology*, 240(1):29-37
  - Soubrié P. (1986). Reconciling the role of central serotonin neurons in human and animal behaviour. *Behavioral and Brain Sciences*, 9:319-364
  - Stöcklin E., Wissler M., Moriggl R. & Groner B. (1997). Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 17:6708-6716
  - Storlien L.H. & Smythe G.A. (1992). D-Fenfluramin effects on hypothalamic monoamine activities and their hormonal correlates. *Brain Research*, 597: 60-65

- Suzuki K, Yamada M, Kurakake S, Okamura N, Yamaya K, Liu Q, Kudoh S, Kowatari K, Nakaji S, Sugawara K (2000). Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 81(4):281-287
- Thorner M.O., Evans W.S. (1984). Is prolactin a marker for brain dopamine function? In: Brown G.M., Koslow S.H., Reichlin S.: *Neuroendocrinology and psychiatric disorders*, New York, Raven Press, pp.55-66
- Thorner M.O., Vance M.L., Horvath E. & Kovacs K. (1992). The anterior pituitary. In: Wilson J.D., Foster D.W.: *Williams textbook of endocrinology*, Philadelphia: W.B. Saunders Company, pp. 221-228
- Törk I. (1990). Anatomy of the serotonergic system. In: Whitaker-Azmitia P.M. & Peroutka S.J.: *Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 600. The neuropharmacology of serotonin*, New York: New York Academy of Sciences, pp.9-34
- Tuomisto J. & Mannisto P. (1985). Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones. *Pharmacological Reviews*, 37:249-332
- Tyson J.E., Hwang P., Guyda H., (1972). Studies on prolactin isecretion in human pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 113:14-20
- Uphouse L. (1997). Multiple serotonin receptors: too many, not enough, or just the right number? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21(5):679-698
- Van de Kar L.D., Rittenhouse P.A., Li Q., Levy A.D. (1996). Serotonergic regulation of renin and prolactin secretion. *Behavioural Brain Research*, 73:203-208
- van Furth R. (1992). Monocytes. In: Roitt I.M. & Delves P.J. (Eds.). *Encyclopedia of Immunology*. London, New York, Tokyo: Academic Press, pp. 1092-1093
- Vekemans M., Delvoeye P., L'Hermite M. et al (1977). Serum prolactin levels during menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 44:989-995
- Verhoeven WM, Tuinier S, van den Berg YW, Coppus AM, Fekkes D, Pepplinkhuizen L & Thijssen JH (1999). Stress and self-injurious behavior; hormonal and serotonergic parameters in mentally retarded subjects. *Pharmacopsychiatry*, 32(1):13-20
- Villar MJ (1994). New concepts relating to histochemistry of the serotonergic neural systems of the raphe nucleus *Acta Psiquiatrica y Psicologica de America Latina*, 40(4):293-300
- Wacker H.H. (1999). Nachweis von Leukozytenantigenen und Immunphänotypisierung. In: Bruhn H.D. :*Lehrbuch der Labormedizin: Grundlagen, Diagnostik, Klinik, Pathobiochemie*. Stuttgart, New York: Schattauer Verlag, p. 410-412
- Wade S.E. (1992). An optimized method for measurement of salivary corticosteroids. In: Kirschbaum C., Read G.F., Hellhammer D. (Eds.): *Assessment of hormones and drugs in saliva in biobehavioral research*, Toronto, Seattle, Bern, Göttingen: Hogrefe & Huber, pp.3-17
- Walker S.E., Allen S.H. & McMurray R.W. (1993). Prolactin and autoimmune disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 4(5): 147-151

- Walton P.E., Cronin M.J. (1990). Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma reduce prolactin release in vitro. *American Journal of Physiology*, 259:E672-E676
- Wardlaw AJ (1994). Eosinophils in the 1990s: new perspectives on their role in health and disease. *Postgrad Medical Journal* 70(826):536-552
- Weigent D. A., Buckingham J.C. & Gilies G.E. (1996). Immunoregulatory properties of growth hormone and prolactin. *Pharmacology and Therapeutics*, 69(3):237-257
- Weiss C. & Jelkmann W. (1990). Funktionen des Blutes. In: Schmidt R.F., Thews G.: *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, pp. 439-441
- Wiedermann C.J., Reinisch N., Niedermuhlbichler M., & Braunsteiner H. (1993). Inhibition of recombinant human growth hormone induced and prolactin induced activation of neutrophils by octreotide *Archives of Pharmacology*, 347: 336-341
- Wiedermann CJ, Schratzberger P & Kahler CM (1994). Migration of neutrophils across endothelial monolayers is stimulated by treatment of the monolayers with beta-endorphin. *Brain, Behavior, and Immunity* 8(3):270-277
- Woody M.A., Welniak L.A., Richards S., Taub D.D. & Murphy W.J. (1999). Use of neuroendocrine hormones to promote reconstitution after bone marrow transplantation. *Neuroimmunomodulation*, 6(1-2):69-80
- Yatham L.N. & Michalon M. (1995). Hormonal responses to dl-fenfluramine challenge are not blunted in seasonal affective disorder. *Psychoneuroendocrinology* 20(4):433-438
- Yatham L.N. & Steiner M. (1993). Neuroendocrine probes of serotonergic function: A critical review. *Life Sciences*, 53:447-463
- Young M.R.I., Kut J.L., Wright M.A., Young M.E., & Matthews J. (1993). Stimulation of splenic T-lymphocyte function by endogenous serotonin and by low-dose exogenous serotonin. *Immunology*, 80:395-400
- Yu-Lee L.Y. (1997). Molecular actions of prolactin in the immune system. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 215(1):35-52
- Zangen A, Nakash R & Yadid G (1999). Serotonin-mediated increases in the extracellular levels of beta-endorphin in the arcuate nucleus and nucleus accumbens: a microdialysis study. *Journal of Neurochemistry*, 73(6):2569-2574
- Zanini A., Giannattasio G., Meldolesi J. (1979). Intracellular events in prolactin secretion. In: McKerns, Jutisz M.: *Synthesis and release of adenohypophysial hormones: Cellular and molecular mechanism*, New York: Plenum Press; pp.53-71
- Zimmer JP, Garza C, Butte NF, Goldman AS (1998). Maternal blood B-cell (CD19+) percentages and serum immunoglobulin concentrations correlate with breast-feeding behavior and serum prolactin concentration. *American Journal of Reproductive Immunology*, 40(1):57-62

## 8. Anhang

- Gesundheitsfragebogen
- Informationsblatt zum Versuch für die Probanden
- Einverständniserklärung zur Studienteilnahme
- Angaben des Probanden zu Person und Tagesablauf
- Einverständnis zur Speicherung persönlicher Daten

## Gesundheitsfragebogen

Fen-Studie

Gesundheitsfragebogen

Bitte beantworten Sie die folgenden Fragen wahrheitsgemäß und so genau wie möglich. Sie können sich darauf verlassen, daß Ihre Angaben streng vertraulich behandelt werden.

Bitte geben Sie an, ob und in welchem Alter Sie die folgenden Krankheiten hatten bzw. haben. Wenn Sie nicht genau wissen, wann Sie eine der Krankheiten hatten, geben Sie bitte eine Schätzung an.

	<u>Früher</u>		falls ja, in welchem Alter?	<u>zur Zeit</u>	
	ja	nein		ja	nein
1. allergische Reaktionen auf Medikamente oder etwas anderes:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ Jahre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Wenn ja, welche Medikamente bzw. was ?	_____			_____	
2. Asthma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ Jahre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. erhöhter Blutdruck	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ Jahre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Herzfehler oder sonstige Herzkrankheiten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ Jahre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Kreislaufstörungen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ Jahre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. chronische Kopfschmerzen oder Migräne	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ Jahre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Leberkrankheiten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ Jahre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Nierenkrankheiten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ Jahre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Harnwegserkrankungen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ Jahre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. Diabetes (Zuckerkrankheit)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ Jahre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. Schilddrüsenunterfunktion	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ Jahre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12. Schilddrüsenüberfunktion	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ Jahre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13. sonstige hormonale Störungen	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ Jahre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
falls ja, welche ?	_____			_____	
14. neurologische Krankheiten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ Jahre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15. Anfallsleiden	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____ Jahre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Waren Sie in den letzten Jahren in ärztlicher Behandlung  
oder im Krankenhaus ? ja  nein

Wenn ja, warum ? \_\_\_\_\_

Waren oder sind Sie in psychiatrischer / nervenärztlicher Behandlung ? ja  nein

Welche Medikamente nehmen Sie zur Zeit (innerhalb der letzten vier Wochen) ein ?  
Bitte ankreuzen und evtl. Präparatnamen eintragen.

<u>Medikamentengruppe</u>	<u>Name</u>	regelmäßig	gelegentlich	gar nicht
Herz-/Kreislaufmittel				
a) zur Kreislaufstabilisierung	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b) gegen Bluthochdruck	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schilddrüsenpräparate	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mittel gegen Magenbeschwerden	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schmerzmittel	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mittel gegen Husten, Schnupfen, Grippe	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Appetitzügler oder appetitanregende Mittel	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Allergiemittel	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ausschwemmungsmittel	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Beruhigungsmittel	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Schlafmittel	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Stimmungsaufheller	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hormone	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
sonstiges	_____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Nehmen Sie alkoholische Getränke zu sich ? Bitte ankreuzen.

	nie	selten	häufig	regelmäßig
Bier	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Wein / Sekt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
hochprozentige Getränke (z.B. Whisky, Gin, ... )	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Wieviele Zigaretten rauchen Sie pro Tag ?

0  1-9  10-14  15-19  20-24  25-29  30 und mehr

Geburtsdatum:

Schulabschluß:

Linkshänder

Rechtshänder

## Informationsblatt zum Versuch (für die Probanden)

Fen-Studie

### Informationen zum Versuch

Nachdem Sie den Gesundheitsfragebogen ausgefüllt haben, lesen Sie sich bitte die Informationen zu der Untersuchung genau durch und stellen Sie anschließend evt. aufgetretene Fragen.

#### Ziel der Untersuchung

In der Studie geht es darum, den akuten Einfluß einer bestimmten Substanz auf eine Reihe von körperlichen Funktionen, wie z.B. Blutwerte, und auf psychische Merkmale, wie z.B. Aufmerksamkeit und Befinden, zu untersuchen.

#### Das Medikament

Das Präparat heißt Isomeride. Es ist d-Fenfluramin, das in Apotheken als Appetitzügler erhältlich ist. Mögliche Nebenwirkungen sind Müdigkeit, Benommenheit, Schwindel, depressive Verstimmung und Magen-Darm-Beschwerden, die jedoch im allgemeinen weniger bei einmaliger, sondern erst bei längerer Einnahme zu erwarten sind. Die hier verwendete Dosierung beträgt einmalig 15 mg und entspricht der Menge einer Tablette des Handelspräparates.

#### Ablauf der Untersuchung

Die Untersuchung findet an zwei Terminen statt, die genau eine Woche auseinanderliegen. Beide Tage laufen im Prinzip gleichartig ab mit dem einzigen Unterschied, daß einmal die Substanz und einmal ein Placebo (unwirksames Präparat) gegeben wird, ohne daß die Probanden wissen, was an welchem Termin an der Reihe ist (dies wird erst im Anschluß an die Durchführung verraten).

Die Untersuchung beginnt jeweils um 14.00 Uhr. Zunächst wird eine Verweilbraunüle (Kanüle) für die Blutabnahme und Elektroden für die physiologischen Maße gelegt. Nach einer Pause werden dann Ausgangsmessungen (Blutabnahme, Speichelprobe, Befindlichkeitsbogen, psychologische Verfahren sowie physiologische Messungen) erhoben und daran anschließend d-Fenfluramin oder Placebo gegeben.

Wiederholungsmessungen werden zu sieben Zeitpunkten des Experiments durchgeführt (Speichel-, Blutproben, Befindlichkeit, psychologische und physiologische Maße).

Aus der Verweilbraunüle werden insgesamt fünf Blutproben à 20 ml entnommen.

Schließlich werden Befindlichkeitsbögen mehrfach vorgelegt, die über ihre momentane Befindenslage Auskunft geben.

Der Zeitaufwand beträgt pro Sitzung ca. 4,5 Stunden, insgesamt also neun Stunden, und wird mit DM 140, – vergütet. Die Bezahlung erfolgt nur bei vollständiger Teilnahme an beiden Sitzungen als Gesamtbetrag am letzten Untersuchungstermin.

*Ein Abbruch des Experiments ist selbstverständlich zu jedem Zeitpunkt möglich.*

Die folgenden Punkte sind Bedingungen und Instruktionen, die von den Teilnehmern gewährleistet werden müssen:

- Bereitschaft zur Teilnahme an beiden Terminen
- Am Vorabend zu jedem Termin nicht nach 24.00 Uhr ins Bett gehen
- An den Untersuchungstagen selbst keine Medikamente einnehmen und keinen Alkohol konsumieren sowie keine koffeinhaltigen Getränke
- Am Vortag der Untersuchung und an den Untersuchungstagen selbst keine Schokolade oder kakaohaltigen Nahrungsmittel, keine Erdnüsse und keine Bananen zu sich nehmen
- An den Untersuchungstagen nicht nach 13.00 Uhr zu Mittag essen
- Nach den Sitzungen kein Auto bzw. Motorrad fahren
- Veränderungen des Gesundheitszustandes zwischen den Terminen unbedingt bekanntgeben
- Psychische oder physische Beeinträchtigungen während der Durchführung sofort melden

## Einverständniserklärung zur Studienteilnahme

Fen-Studie

### Einverständniserklärung

Ich erkläre mich bereit, an der geschilderten Untersuchung teilzunehmen und verpflichte mich, zu beiden Terminen zu erscheinen, es sei denn, daß zwingende Gründe einen Abbruch unvermeidbar machen. In diesem Fall werde ich unverzüglich unter der Telefonnummer: **0641 / 48202**  
oder: **0641 / 702 5426**  
oder: **06408 / 4552**  
Bescheid geben.

Die Teilnahme an beiden Terminen ist Voraussetzung für die Bezahlung von DM 140, -- , die am Ende des zweiten Untersuchungstages ausgezahlt werden.

Ich bin mit einer einmaligen Gabe von d-Fenfluramin (15 mg) einverstanden und bin über die möglichen Nebenwirkungen ausreichend informiert worden.

Ich erkläre mein Einverständnis zur Abnahme von Blutproben (5 je Sitzung mit 30 ml pro Meßzeitpunkt) sowie zur Entnahme von Speichelproben, zur Aufzeichnung von physiologischen und psychologischen Meßwerten während beider Sitzungen.

Ich gewährleiste:

- an den beiden Untersuchungstagen um 14.00 Uhr pünktlich im PHIL I, 5.Stock Raum 508 einzutreffen. Die beiden Termine für die Untersuchung sind:

Wochentag	Datum

- an Untersuchungstagen und den jeweiligen Vortagen keine Medikamente, Schokolade oder kakaohaltige Speisen u. Getränke, Nüsse oder Bananen zu mir zu nehmen.
- an den Vorabenden eines Untersuchungstages vor 24.00 Uhr zu Bett zu gehen.
- an den Untersuchungstagen vor 13.00 Mittag zu essen und am Untersuchungstag keine Coffein-haltigen Getränke zu trinken.
- psychologische und körperliche Begleiterscheinungen vor, während und nach den Versuchen unmittelbar den Untersuchungsleitern mitzuteilen.
- Nach Abschluß der jeweiligen Versuchstage kein Auto zu fahren. Ich habe Anspruch auf die Erstattung der Fahrtkosten für die Heimfahrt, falls erforderlich.

Ich habe die Fragen im Gesundheitsfragebogen sowie alle anderen wahrheitsgemäß und gewissenhaft beantwortet und habe keine weiteren Fragen an die Versuchsleiter. Mir ist gesagt worden, daß ich den Versuch abbrechen kann.

Gießen, den

\_\_\_\_\_  
(Unterschrift)

## Angaben zur Person und Protokoll über Tagesablauf (vom Probanden auszufüllen)

Ipsapiron-Studie und Fen-Studie

### Angaben zur Person und Protokoll über Tagesablauf

VP.-Nr.: \_\_\_\_\_

Gewicht: \_\_\_\_\_ kg

Größe: \_\_\_\_\_ cm

Geb. Datum: \_\_\_\_\_

Ich bin am Vorabend schlafen gegangen um \_\_\_\_\_ Uhr

Ich bin heute aufgewacht um \_\_\_\_\_ Uhr

Ich bin heute aufgestanden um \_\_\_\_\_ Uhr

Ich habe heute Nacht geschlafen \_\_\_\_\_ Stunden

**Meine letzte Mahlzeit war um \_\_\_\_\_ Uhr**

**sie bestand aus** Brot/Snack

warme Mahlzeit

**Meine heutigen Tätigkeiten bestanden aus:**

**körperliche Aktivität**  
(z.B. Radfahren, Sport, Laufen,  
o.ä.)




**in sitzender Aktivität**  
(Lernen, Schreiben o.ä.)




von 8-10 Uhr

von 10-12 Uhr

von 12-15 Uhr

(Bitte auch beide Kästchen ankreuzen falls zutreffend !)

**Ich bin hierher in den 5. Stock gekommen:**

mit dem Fahrstuhl

zu Fuß

**Mein persönlicher Eindruck sagt mir:**

ich habe heute das Verum (richtiges Medikament) bekommen

ich habe heute das Placebo bekommen

## Einverständniserklärung zur Speicherung persönlicher Daten

Fen-Studie

Lieber Proband,

wir danken Ihnen für Ihre Bereitschaft, an unserer Studie teilzunehmen.

Es wird voraussichtlich im WS 1995/96 eine Anschlußuntersuchung stattfinden, für die wir Probanden benötigen, die bereits an dem nun stattfindenden ersten Teil der Untersuchung teilgenommen haben.

Wir würden uns daher freuen, wenn wir Sie im Winter erneut unverbindlich kontaktieren dürften, wenn die Folgeuntersuchung beginnt. Hierzu benötigen wir Ihr Einverständnis, Ihren Namen und Ihre Telefonnummer zu diesem Zweck speichern zu dürfen. Wenn Sie eventuell Interesse an der Teilnahme an diesem oder weiteren Versuchen haben, füllen Sie bitte die untenstehende Erklärung aus.

Für die Teilnahme an der Folgeuntersuchung im Winter 1995/96 wird es einen „Teilnahme-Bonus“ von 250,- DM geben.

Bitte teilen Sie uns eine eventuelle Änderung Ihrer Telefonnummer mit, damit Sie nicht die Chance zur Teilnahme an weiteren Untersuchungen verlieren.

Sie erreichen uns unter folgender Adresse:

Justus-Liebig-Universität Gießen,  
- FB 06 Psychologie -  
AG Prof. Dr. Dr. P. Netter  
Otto-Behagel-Str. 10/F  
35394 Gießen  
Tel.: 0641 / 702-5426 (Sekretariat Frau Grünfelder)

Corinna

Gabi

Ruth

Paul

Claudia



### Einverständniserklärung

Name: \_\_\_\_\_ Vorname: \_\_\_\_\_

Telefon: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, daß mein Name und meine Telefonnummer gespeichert werden, und daß ich als potentieller Proband für Untersuchungen des Instituts für Psychologie der JLU Gießen telefonisch kontaktiert werden darf. Ich verpflichte mich hiermit *nicht* zu einer Teilnahme an den Experimenten.

Gießen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Unterschrift)

## 9. Lebenslauf

von

Paul Friedrich Fäßler

Geburtsdatum: 22. Dezember 1970

Geburtsort: Regensburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

1977-1981	Grundschule Großberg
1981-1990	Gymnasium Neutraubling
05/1990	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
1990-1991	Zivildienst beim Caritasverband Regensburg
1991-1992	zehnmonatiger Auslandsaufenthalt
10/1992	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig–Universität Gießen
09/1994	Ärztliche Vorprüfung
04/1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/1998	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1998	Hochschulwechsel zur Ludwig-Maximilians-Universität München
11/1998-10/1999	Praktisches Jahr an der Medizinischen Poliklinik der LMU München, am Krankenhaus Dritter Orden München und am Kantonsspital Luzern, Schweiz
11/1999	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 05/2000	Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der traumatologischen Abteilung der Kreisklinik Dachau

## **10. Danksagung**

Für die freundliche Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung der gesamten Arbeit gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Dr. Petra Netter, Leiterin des Institutes für Differentielle Psychologie und Diagnostik der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Weiterhin danke ich auch Herrn PD Dr. Dr. rer. nat. Jürgen Hennig, der als Mitarbeiter des Fachbereichs Differentielle Psychologie der JLU Gießen durch seine große Hilfe und kompetente Beratung, insb. bei der statistischen Auswertung, maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Danke sagen möchte ich außerdem meiner Lebensgefährtin Margrit Knop, die, durch unermüdliches Korrekturlesen dieser Arbeit, zu einer orthographisch korrekten Form – bei neu eingeführten Rechtschreibregeln! – entschieden beigetragen hat.

Desweiteren bedanke ich mich bei meinen Kommiliton(inn)en und Freunden aus Gießen Patrick Schonlau, Claudia Toll, Gabi Meinke, Corinna Hennemann, Lucia Niebler, Tanja Koradin und Rüdiger Arnold, die durch ihre direkte und indirekte Hilfe dieser Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss verholfen haben.

Nicht zuletzt möchte ich auch meinen Eltern von ganzem Herzen danken, dass sie mir das Studium der Medizin, wenn es auch etwas länger gedauert hat, und diese Dissertation durch ihre fortwährende geistig-moralisch-materielle Unterstützung ermöglichten.

Allen nochmals ein herzliches Dankeschön!!

## **11. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit an Eides Statt,

1. dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Der Einfluss serotonerger Stimulation auf die Migration peripherer Leukozyten unter Berücksichtigung der potentiellen Mediatorrolle von Prolaktin“

selbständig und ohne Anwendung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; dass ich nicht selbst erhobene Befunde und/oder Ergebnisse nach ihrer Herkunft eindeutig gekennzeichnet habe,

2. dass die Ergebnisse dieser Arbeit an keiner anderen Fakultät Gegenstand eines Promotionsverfahrens gewesen sind,

3. dass die Arbeit bisher nicht veröffentlicht wurde.

München, den