

Thi Thanh Trang Nguyen

Dr. med.

Effekte urämischer Seren auf die Sekretion von Gonadotropin- Releasing-Hormone (GnRH) durch immortalisierte Hypothalamus- Neuronen: ein Modell der neuroendokrinen Dysregulation bei Niereninsuffizienz

Geboren am 18. 12. 1971 in Tan Son Hoa/ Vietnam

Reifeprüfung am 22. 06. 1992 in Landau/ Rheinland Pfalz

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1993 bis WS 1999

Physikum am 30. 03. 1995 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 08. 11. 1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Kinderheilkunde

Doktorvater Priv.-Doz. Dr. med. Franz Schäfer

In der vorliegenden Arbeit wurde die GnRH- Sekretion unter urämischen Bedingungen mit Hilfe des hypothalamischen GT1-7- Neuronen untersucht. Die Neuronen bilden in Zellkultur neuronale Netzwerke und produzieren spontan pulsatile GnRH.

Es wurde urämisches und nicht urämisches Serum von männlichen 5/6 nephrektomierten bzw. scheinnephrektomierten Ratten nach Orchidektomie zur Inkubation der GT1-7 Neuronen verwendet. Desweiteren wurden drei Substanzen (PTH, Vit D₃, Leptin) in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen, die in der Urämie bzgl. Ihrer Produktion, Clearance und/oder ihrer Genexpression verändert sind, auf ihren Einfluss auf die GnRH-Sekretion bei GT1-7 Zellen untersucht. Zusätzlich wurden die Zellen dem Einfluss eines azidotischen Milieus ausgesetzt und die GnRH- Sekretion beobachtet. In einem weiteren Schritt sollte mit Hilfe der Serumfraktionierung die Molekulargewichtsklasse der für die Störung des GnRH-Pulsogenerators verantwortlichen Substanzen bestimmt werden.

Die Messung der GnRH- Konzentration im Überstand nach 1h, 24 h Seruminkubation und im Zellysate wurde mit Hilfe eines GnRH- Radioimmunoassays vorgenommen.

Die GnRH- Genexpression wurde durch eine mRNA- Bestimmung mittels Northern Blot untersucht. Die Apoptoseraten wurden durch einen terminalen Desoxyribonukleotidyltransferase-Assay bestimmt.

Wir fanden eine **Reduktion** der extrazellulären GnRH- Konzentration um $20 \pm 4,1\%$ ($p < 0,01$) bei den Zellen nach Inkubation mit urämischem Serum nach 1 h und um $30,5 \pm 4,1\%$ ($p < 0,001$) nach 24 h.

Die intrazelluläre Konzentration stieg um $11,5 \pm 1,1\%$ in den urämischen Zellen ($p < 0,002$) nach 24 h Seruminkubation. Durch Zellviabilitätsprüfungen mit dem Trypanblau-Exklusionstest und Bestimmung der Apoptose wurden zytotoxische und proapoptische Effekte des urämischen Serums ausgeschlossen. Auch die vorbeschriebenen in der Urämie veränderten Substanzen (Leptin, PTH und Vitamin D₃) zeigten bei den GT1-7 Neuronen keine Beeinflussung der GnRH-Sekretion.

Azidose bewirkte eine **Reduktion** der extrazellulären GnRH-Sekretion um $21,7\%$ ($p = 0,01$) nach 24 h. Intrazellulär stieg die GnRH- Konzentration um $48,5\%$ (n.s.).

Die Ergebnisse der Inkubation mit Molekulargewichts-Fraktionen zeigten sowohl inhibitorische als auch überraschenderweise *stimulierende* Effekte. Netto überwog die Inhibition der GnRH- Sekretion durch die großmolekulare Fraktion MG > 50 kDa mit $70,1 \pm 7,8\%$ der Kontrollwerte ($p = 0,0009$) bei den urämischen Zellen. Die Stimulation ging von den Fraktionen mit kleinen Molekulargewichten aus: < 5 kDa, 20-50 kDa. Die urämischen Zellen zeigten eine extrazelluläre GnRH- Konzentration von $119 \pm 5\%$ der Kontrollwerten in der Fraktion 20-50 kDa ($p = 0,014$) und von $127 \pm 2\%$ der Kontrollwerten in der Fraktion < 5kDa ($p = 0,008$).

Die GnRH- Halbwertszeit unterschied sich nicht zwischen urämischem und nicht urämischem Serum. Durch Hitzeinaktivierung und Zugabe des spezifischen GnRH- Endopeptidase-Hemmers war zwar die Abbaurate verringert; jedoch fanden sich weiterhin Unterschiede in der GnRH- Sekretion zwischen den urämischen und den Kontrollzellen. Desweiteren fanden wir bei der Untersuchung der GnRH- Genexpression keine signifikante Veränderung zwischen urämischen und Kontrollzellen.

Aus den vorliegenden Daten können wir schlussfolgern, dass das GT1-7 Neuronenmodell zur Untersuchung der GnRH- Sekretion bei Urämie geeignet ist. Die Daten lassen vermuten, dass urämisches Serum offenbar Substanzen enthält, welche die GnRH- Sekretion, nicht aber die GnRH-Genexpression in GT 1-7 Neuronen hemmen. Sie befinden sich in der hochmolekularen Serumfraktion $MG > 50$ kDa und sind thermostabil.