

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Else-Krüner-Fresenius-Zentrum für Ernährungsmedizin

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.- Prof. Dr. J. J. Hauner)

Neuroendokrine Regulation der Ghrelinsekretion
Einfluss des Opioidsystems auf die Ghrelinsekretion des
Rattenmagens

Michaela Anja Vogel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. E.J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. V. H. Schusdziarra
2. Univ.- Prof. Dr. St. Engelhardt

Die Dissertation wurde am 30.8.2011 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.4.2012 angenommen.

Für meine Eltern

Inhalt

1.	Einleitung	7
2.	Material und Methoden	10
2.1	Übersicht	10
2.2	Versuchstiere	10
2.3	Präparation	11
2.4	Perfusion	13
2.5	Versuchsprotokolle	15
2.5.1	Vagusstimulation	15
2.5.2	Endogene Opioide	16
2.5.2.1	Versuche mit endogenen Opioiden	16
2.5.2.2	Versuche unter zusätzlicher Inhibition mit Naloxon	17
2.6	Auswertung	19
2.6.1	Radioimmunoassay	19
2.6.2	Ghrelinbestimmung	19
2.6.3	Statistik	20
3.	Ergebnisse	21
3.1	Vagusstimulation	21
3.2	Effekte endogener Opioide auf die vagal stimulierte Ghrelinfreisetzung	21
3.2.1	Endomorphine	22
3.2.2	β -Endorphin	23
3.2.3	Nociceptin	27
3.2.4	Dynorphin	29
3.3	Versuche mit Naloxon	32
3.3.1	Einfluss von Naloxon auf die Ghrelinfreisetzung	32

3.3.2	Einfluss bei simultaner Gabe von Endomorphinen	33
4.	Allgemeine Diskussion	34
4.1	Ghrelin	34
4.1.1	Die Growth-Hormone-Secretagogues - Entdeckung des Ghrelins	34
4.1.2	Struktur und Prozessierung des Ghrelins	35
4.1.3	Ghrelinderivate	37
	4.1.3.1 Allgemein	37
	4.1.3.2 Des-Acyl-Ghrelin	38
4.1.4	Produktionsorte des Ghrelins	38
	4.1.4.1 Der Magen und andere gastrointestinale Organe	38
	4.1.4.2 Gehirn und Hypophyse	39
	4.1.4.3 Andere Gewebe	40
4.2	Der Ghrelin-Rezeptor	41
4.2.1	Die Ghrelin-Rezeptor Familie	41
4.2.2	Die Aktivierung des Ghrelin-Rezeptors und Signalweiterleitung	42
4.2.3	Die Verteilung des Ghrelin-Rezeptors	42
4.3	Die physiologischen Funktionen des Ghrelins	43
4.3.1	GH-Releasing-Aktivität	43
4.3.2	Die Appetitregulation	44
	4.3.2.1 Allgemeine Mechanismen der Körpergewichtsregulation	44
	4.3.2.2 Ghrelin und die Regulation der Nahrungsaufnahme	46
	4.3.2.2.1 Ghrelin als Hungersignal	46
	4.3.2.2.2 Mechanismus der Appetitstimulation durch Ghrelin	47
	4.3.2.2.3 Der Nervus vagus und die Appetitstimulation durch Ghrelin	48
	4.3.2.2.4 Zusammenhang zwischen Ghrelin und Appetit	49
4.3.3	Gastrointestinale Funktionen	50
4.3.4	Kardiovaskuläre Funktionen	51
4.3.5	Ghrelin und die Pankreasfunktion	52
4.3.6	Leben ohne Ghrelin	53
	4.3.6.1 Ghrelin knock-out Mäuse	53
	4.3.6.2 GHS-R knock-out Mäuse	54

4.3.6.3	Die totale Gastrektomie	54
4.3.6.4	Gastric-Bypass-Operation	54
4.4	Die Regulation der Ghrelin-Sekretion	55
4.4.1	Allgemeine Regulationsmechanismen	55
4.4.2	Nahrungszusammensetzung und Ghrelinsekretion	56
4.4.3	Nervus vagus und Ghrelinsekretion	56
4.4.4	Gastrointestinale Hormone und Ghrelinsekretion	57
4.4.5	Ghrelin und die Blut-Hirn-Schranke	57
5.	Spezielle Diskussion- Das endogene Opioid-System	59
5.1	Allgemein	59
5.1.1	Opioid-Rezeptoren	60
5.1.2	Wirkungsmechanismen der Opioid-Rezeptoren	61
5.1.3	Opioiderge Systeme im Organismus	61
5.1.4	Gastrointestinaltrakt und endogenes Opioidsystem	62
5.1.5	Endogenes Opioidsystem und Appetitregulation	64
5.1.5.1	Genussbedingte Nahrungsaufnahme	64
5.1.5.2	Strukturelle Grundlagen der Opioidwirkung auf den Appetit	66
5.2	Wirkung spezifischer endogener Opioiden auf die Ghrelinsekretion	67
5.2.1	Pro-opiomelanocortin (POMC) – Endorphine	67
5.2.2	Prodynorphin - Dynorphine	69
5.2.3	Pronociceptin/Orphanin FQ - Nociceptine/Orphanin-FQ	70
5.2.4	Endomorphine	72
6.	Zusammenfassung	73
7.	Verzeichnis Abbildungen und Tabellen	76
8.	Literaturverzeichnis	78
9.	Danksagung	100

1. Einleitung

Die Entstehung von Appetit und das Ernährungsverhalten von Lebewesen ist seit langem ein spannendes, viel umforschtes Gebiet. Seit den Versuchen von Pavlov vor über einem Jahrhundert hat die Erforschung über die Kommunikation zwischen dem Gastrointestinaltrakt und dem zentralen Nervensystem große Fortschritte gemacht. Vor allem in der heutigen Zeit, in der Übergewichtigkeit und ihre Folgen für den gesamten Organismus auf dem medizinischen und gesellschaftlichen Sektor eine immer wichtigere Rolle spielen, ist es essentiell, die zugrunde liegenden physiologischen und pathophysiologischen Regulationsmechanismen der Appetit- und Sättigungsmechanismen zu verstehen.

Die Monica-Studie der WHO zeigte eine Zunahme der Adipositas in den letzten 10 Jahren bei $\frac{3}{4}$ der männlichen Bevölkerung weltweit, bei der Hälfte der Betroffenen waren die Veränderungen signifikant (Evans et al. 2001).

War beispielsweise in England 1990 der Anteil der Adipositas (= BMI >30) in der Bevölkerung zwischen 35-64 Jahren bei 10-15% und des Übergewichts (= BMI >25) bei 40-50%, geht die International Obesity Task Force davon aus, dass im Jahr 2020 38% der Frauen und 34% der Männer unter Fettleibigkeit leiden werden (Prentice et al, 2004).

Die starke Korrelation der Adipositas mit Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen, Gallenblasenleiden, Osteoarthritis, die Assoziation zu Malignomen, Schlafstörungen und Störungen in der mentalen Entwicklung machen sie zu einer der größten Gefahren für die Gesundheit in der westlichen Welt.

Es wurde gezeigt, dass ein BMI von 26,0 bei Männern und 24,5 bei Frauen mit der größtmöglichen gesundheitsabhängigen Lebensqualität (HRQoL= Health-related quality

of life) assoziiert ist (Soltoft et al, 2009). Fast alle Aspekte der HRQoL werden durch einen erhöhten BMI negativ beeinflusst.

Aufklärungskampagnen und Beratungsgespräche über den Wert einer gesunden Lebensführung mit Diäten und körperlicher Betätigung, sowie medikamentöse Therapien konnten den Anstieg der Fettleibigkeit nicht verhindern. Die meisten Verfahren führen nur zu einem maximalen Gewichtsverlust von 10%. Die gastrointestinale Operation ist derzeit die effektivste Therapie für einen langzeitigen Gewichtsverlust. Sie kann zu einem Gewichtsverlust von bis zu 50% führen. Dieser ausgeprägte und lang anhaltende Effekt unterstreicht die Rolle der gut-brain-Kommunikation über vagale Innervation und über humorale Botenstoffe bei der Entstehung von Adipositas. Diese Therapieoption ist aufgrund der mit einem solchen Eingriff assoziierten Morbidität und möglichen Komplikationen nur auf ausgewählte Patienten beschränkt.

In Industrie und Wissenschaft sucht man intensiv nach einem möglichen pharmakologischen Ansatz zur Gewichtsreduktion. Um effektive Maßnahmen gegen das Übergewicht zu entwickeln, ist es essentiell die Physiologie der normalen Appetitkontrolle und die Pathophysiologie der Fettleibigkeit zu kennen.

Das Körpergewicht wird durch verschiedene komplexe Regulationsmechanismen stabil gehalten. Angesichts der täglich wechselnden Menge und Zusammensetzung der aufgenommenen Nahrung ist die Langzeit-Energiebilanz des Körpers bemerkenswert konstant. Allerdings hat das gesamte System des Energiehaushaltes die Tendenz, Energiereserven anzulegen um die Versorgung in Zeiten mit Nahrungsmangel sicher zu stellen. Diese Tendenz erklärt sich aus der Evolutionsgeschichte. In früheren Zeiten war es für den Menschen besser, Energiereserven auf zu bauen, auch wenn diese aktuell unnötig waren, als unter Nahrungsmangel zu leiden. Aus dieser angeborenen Tendenz Energievorräte anzulegen erklärt sich die zunehmende Fettleibigkeit in unserer Zeit, in der die Bewegung weniger, die Ernährung dafür umso kalorienhaltiger und üppiger wird. (Wilding 2002)

Hinweise auf ein komplexes Kommunikationsnetzwerk zwischen dem ZNS und dem Gastrointestinaltrakt häufen sich seit der Entdeckung, dass viele intestinale Hormone, wie Gastrin, Somatostatin, CCK, PP und PYY, von denen man angenommen hatte, dass sie auf ihre Zielorgane im Verdauungstrakt über den endokrinen Signalweg wirken, auch einen neuralen Pfad für ihre Informationsübertragung nützen. 1999 wurde mit Ghrelin ein neues Peptidhormon dieses Informationsnetzwerkes entdeckt. Es stellt einen endogenen

Liganden für den Growth-Hormone-Secretagogue-Rezeptor dar. Es wird hauptsächlich im Magen produziert und als Antwort auf chronische und akute Änderungen des Ernährungszustandes ausgeschüttet. Ghrelin stimuliert auch die Nahrungsaufnahme und überträgt Signale an die hypothalamischen Regulationszentren der Energiehomöostase. Es stellt für viele Wissenschaftler das fehlende Bindeglied in der sog. Brain-gut-axis dar. Viele Studien in der Vergangenheit beschäftigen sich hauptsächlich mit der Nahrungsaufnahme zur Deckung des Energiebedarfs. Tiere und Menschen essen aber aus einer Vielzahl von Gründen, zu denen neben dem Energiebedarf auch die Tageszeit, soziale Situationen, Stress, Langeweile und der Genuss, bzw. der Belohnungseffekt und die Zufriedenheit die ein gutes Essen auslösen, gehören. In der heutigen Zeit sind es vor allem diese, vom Energiebedarf unabhängigen Faktoren, die zur Adipositas führen. Die endogenen Opioiden gehören zu den Neuroregulatoren, die genau diesen Aspekt des Genusses bei der Nahrungsaufnahme beeinflussen. Ziel dieser Arbeit war es, die Verknüpfung zwischen Ghrelin und den endogenen Opioiden darzustellen und zu zeigen, wie sie sich gegenseitig beeinflussen.

2. Material und Methoden

2.1 Übersicht

Bei den Versuchen wurde eine Operationstechnik verwendet, die von Schusdziarra und Mitarbeitern 1983 (Schusdziarra, Bender et al. 1983) etabliert wurde. Hierbei wurde der isolierte Rattenmagen in vitro über einen Katheter im Truncus coeliacus perfundiert. Das Perfusat wurde während eines vorgeschriebenen Zeitraumes über eine Kanüle in der Pfortader aufgefangen und gesammelt. Die gewünschten endokrinen Parameter konnten dann in diesem Perfusat mittels Radioimmunassay bestimmt werden.

Um möglichst unverfälschte physiologische Bedingungen herzustellen, wurde der intragastrale pH-Wert von 2 durch luminale Perfusion des Magens eingestellt und konstant aufrechterhalten. Der Magen selbst befand sich während des Versuches in einem Organbad mit auf 37°C temperierten Krebs-Ringer-Puffer.

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Wistarratten (Charles River Wiga GmbH, Sulzfelden, Deutschland) mit einem Gewicht von 200 – 400g verwendet. Die Tiere wurden im Veterinärbereich des Instituts für experimentelle Onkologie und Therapieforchung der Technischen Universität München gemäß den Tierschutzbestimmungen unter standardisierten Bedingungen gehalten. Bei einem künstlichen Tag-/Nacht-Rhythmus, einer Raumtemperatur von 20-23°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60-70% erhielten sie Alleinfuttermittel für Ratten (Altromin GmbH, Lage), sowie Wasser ad libitum.

Vor Versuchsbeginn wurden die Versuchstieren für mindestens 12 Stunden nüchtern gesetzt, hatten jedoch weiterhin freien Zugang zu Wasser. Die Zuordnung zu Versuchs- und Kontrollgruppe erfolgte randomisiert.

2.3 Präparation

Die Ratten wurden nach einer Kurznarkose mit Kohlendioxid zunächst gewogen und dann entsprechend ihres Gewichtes, durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, Rhone-Merieux GmbH, Laupheim) in einer Dosierung von 50 mg/kg KG narkotisiert. Nach Eintreten einer adäquaten Narkosetiefe wurden sie in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert.

Die Operation begann mit der Eröffnung des Abdomen mittels eines etwa 5 cm langen Längsschnittes in der Mediane entlang der Linea alba. Um das Präparationsfeld zu vergrößern wurde die seitliche Bauchwand jeweils ca. 1,5 cm tief eingeschnitten. Durch vorherige doppelte Ligatur der Vasa epigastrica auf beiden Seiten wurde ein unnötiger Blutverlust vermieden.

Dann erfolgte die Darstellung und anschließende Mobilisierung des Magens. Hierzu wurden sämtliche Magenligamenta aufgesucht und durchtrennt. Milz und Omentum majus wurden nach Ligatur der sie versorgenden Gefäße, unter Schonung der Vasa gastroepiploica an der großen Kurvatur, entfernt. Das Pankreas, das größtenteils im Mesenterium des Duodenums liegt, wurde durch Ligatur der Gefäße vom Truncus coeliacus abgesetzt. Nach doppelter Ligierung erfolgte die Durchtrennung des Duodenums ca. zwei Zentimeter distal des Pylorus.

Als nächstes wurde die Aorta abdominalis vom Abgang des Truncus coeliacus bis zur Arteria renalis sinistra dargestellt. Der Magen wurde nach rechts verlagert und das Gefäßbett vorsichtig freipräpariert. Die dorsalen Abgänge der Aorta, die Arteria mesenterica superior und, soweit als anatomische Variation vorhanden, die Arteria renalis dexter, wurden nach doppelter Ligierung durchtrennt. Danach wurde die Aorta dreifach angeschlungen: eine Schlinge proximal des Truncus coeliacus, zwei zwischen Truncus

coeliacus und Arteria mesenterica superior. Die Schlingen wurden angebracht, jedoch noch nicht zugezogen. Nach distal wurde die Aorta durch eine Ligatur unmittelbar proximal des Abgangs der Arteria renalis sinistra komplett verschlossen. Nach Anlegen einer Arterienklemme unmittelbar kranial des Truncus coeliacus, erfolgte die Einführung eines Katheters (Silastic-Katheter, Portex Inc., Hythe, England, \varnothing 0,75 mm) durch eine Inzision zwischen Aorta und Arteria mesenterica superior. Der Katheter wurde bis zum Truncus coeliacus vorgeschoben und mit den beiden unteren der zuvor geschlungenen Fäden doppelt fixiert. Danach wurde die Arterienklemme wieder geöffnet, um die Durchblutung des Magens für die verbleibende Präparationszeit zu ermöglichen. Die Ischämiezeit des Magens während der Aortenkanülierung betrug etwa eine Minute. Im Fortgang der Präparation wurde der Katheter alle zwei Minuten mit etwa 0,2 ml heparinierter isotonischer Kochsalzlösung (25.000 I.E. Liquemin® auf 1000 ml 0,9%ige Kochsalzlösung) angespült, um eine Thrombosierung zu vermeiden.

Der Magen wurde wieder nach links verlagert und die Mesenterien des Darmes dargestellt. So konnte nach vorsichtiger Präparation eine Darmvene mit einem selbst hergestellten Katheter, bestehend aus einer abgestumpften Injektionsnadel (Becton Dickinson, Fraga, Spanien, Größe 1), auf die ein ausgezogener Vinylschlauch (\varnothing ca. 1mm) gezogen wurde, kanüliert werden. Der Katheter wurde bis zur Einmündung der Vena gastro-omentalis dextra vorgeschoben und durch zwei Schlingen fixiert. Danach konnte der gesamte Dünndarm, sowie der größte Teil des Colons am Mesenterium abgetrennt und entfernt werden.

Nachdem der möglichst proximalen Durchtrennung des Oesophagus in seinem subdiaphragmalen Anteil, wurde schließlich die verbleibende offene Schlinge um die Aorta, proximal des Truncus coeliacus, zugezogen und die Durchblutung des Magens endgültig unterbrochen. Nach der Ligatur der Vena portae im Ligamentum hepatoduodenale wurde der Magen gründlich mit etwa 10 ml heparinierter isotoner Kochsalzlösung gespült, um Blutreste zu entfernen und einer Thrombosierung entgegenzuwirken. Schließlich wurde der Magen unter Erhaltung der Gefäßversorgung aus dem Situs geschnitten. Am Präparat wurden je ein Katheter in den Oesophagus (abgeschnittene Perfusor®-Leitung, Typ N, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) und durch das Duodenum in den Magen (Modifizierter Frauenkatheter, CH14, B.Braun

Melsungen AG, Melsungen) eingeführt und fixiert, um den Magen auch luminal zu perfundieren und somit den intragastralen pH-Wert konstant zu halten. Zur Entfernung möglicher Nahrungsreste wurde der Magen über den Oesophaguskatheter mit etwa 20 ml isotoner Kochsalzlösung durchgespült. Das Präparat wurde in einem auf 37°C angewärmten, mit Krebs-Ringer-Puffer gefüllten Organbad aufgehängt und an das Perfusionssystem angeschlossen. Schließlich mussten die Nervi vagi seitlich des Oesophagus durch zwei bipolare Platinstimulationselektroden aufgegriffen und unter leichtem Zug gespannt werden. Über einen elektrischen Impulsgeber konnte so je nach Versuchsprotokoll eine elektrische Stimulation der Nerven erfolgen. Bei einer Gesamtdauer der Präparation von etwa 40-45 Minuten betrug die Ischämiezeit zwischen Ligatur der Aorta abdominalis und der maschinellen Perfusion mit oxigeniertem Puffer etwa vier Minuten.

2.4 Perfusion

Sowohl die vaskuläre, als auch die luminale Perfusion des Magens erfolgte mittels einer Rollerpumpe (STA-Schlauchpumpe, Desaga GmbH, Heidelberg) mit einer Geschwindigkeit von 1,5 ml/min. Die infundierten Flüssigkeiten wurden wie das Organbad konstant auf einer physiologischen Temperatur von 37°-38°C gehalten.

Für die vaskuläre Perfusion wurde ein modifizierter Krebs-Ringer-Puffer mit folgender Zusammensetzung verwendet: 154 mM Natriumchlorid, 4,5 mM Kaliumchlorid, 2,5 mM Calciumchlorid, 1,2 mM primäres Kaliumhydrogenphosphat, 1,2 mM Magnesiumsulfat, 21,1 mM Natriumhydrogencarbonat, 5,5 mM Glucose, 2 g/l Humanalbumin, 40 g/l Dextran T70. Gegebenenfalls wurden gemäß Versuchsprotokoll weitere Substanzen, wie beispielsweise Peptide, hinzugefügt. Die zu infundierenden Lösungen wurden mit 1 M Salzsäure auf einen physiologischen pH-Wert von 7,35 titriert und mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) gesättigt. Das Perfusat wurde aus dem Portalvenenkatheter abgeleitet und durch einen Fraktionierer (2212 Helirac, LKB Bromma) in einminütigen Intervallen gesammelt. Die so gewonnenen Proben wurden bis zur Auswertung mittels Radioimmunoassay bei -18°C eingefroren. Die Herkunft der verwendeten Stoffe ist in Tabelle 1 im Einzelnen aufgelistet.

Um den intragastralen pH-Wert konstant zu halten wurde der Magen luminal mit isotoner Natriumchloridlösung perfundiert, die je nach Versuchsaufbau mit 1 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 2,0 eingestellt wurde. Das luminale Perfusat wurde verworfen.

Substanz	Hersteller
Natriumchlorid 0,9%ige Lösung	Deltaselect GmbH, Pfuldingen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat, primäres	Merck, Darmstadt
Liquemin 2500IE/5ml	Roche AG, Grenzach-Wyhlen
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Glucose 5%ige Lösung	Deltaselect GmbH, Pfuldingen
Humanalbumin 20%	Pharmacia & Upjohn GmbH
Salzsäure 1M	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München
Carbogen	Linde AG, Wiesbaden
Natronlauge	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München
Endomorphin-1	Bachem, Bubendorf
B-Endorphin	SIGMA, Steinheim
Dynorphin	SIGMA, Steinheim
Nociceptin	Bachem, Bubendorf
Naloxon	SIGMA, Steinheim

Tabelle 1: Herkunftsverzeichnis der verwendeten Substanzen.

2.5 Versuchsprotokolle

Nach der Präparation ging den eigentlichen Messungen grundsätzlich eine Äquilibrationsphase von 15 Minuten voran, während der das Perfusat nicht gesammelt wurde. Danach wurden die Proben in einem einminütigen Intervall gesammelt und eingefroren. Die Stimulation der Nervi vagi durch einen elektrischen Rechteckimpulsgeber (Grass S88, Grass Instruments, USA) wurde monophasisch bei einer Spannung von zehn Volt und einer Impulsdauer von einer Millisekunde durchgeführt. Der intragastrale pH wurde auf 2,0 eingestellt.

2.5.1 Vagusstimulation

Für die meisten im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Versuchsprotokolle war es notwendig, zuvor zu klären, ob die elektrische Stimulation des Nervus vagus auch über einen längeren Zeitraum von 40 Minuten eine konstant elevierte Sekretion hervorzurufen vermag. Diese Versuche wurden bei einem intragastralen pH von 2,0 und Stimulationsfrequenzen von 10 Hz durchgeführt. Der 40minütigen Stimulation gingen, wie bei allen Versuchen, eine Äquilibrationsphase von 15 Minuten und eine zehnminütige Vorlaufphase voraus. An die Stimulationsphase schloss sich eine ebenfalls zehnminütige Nachlaufphase an.

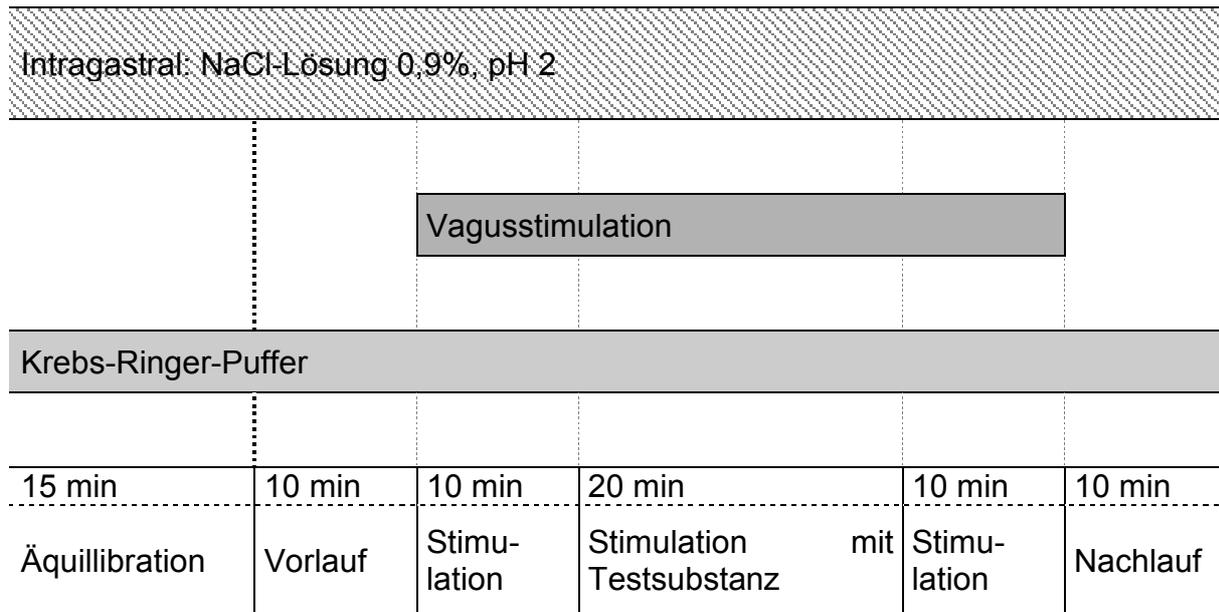


Abbildung 1: Versuchsschema zur Austestung der Wirkung elektrischer Vagusstimulation bei 10 Hz über einen Zeitraum von 40 Minuten. Während des gesamten Versuches wurde vaskulär mit Krebs-Ringer-Puffer und luminal mit einer auf pH 2 titrierten isotonen Natriumchloridlösung perfundiert. Dem Beginn der Elektrostimulation ging eine stimulationsfreie Phase von 25 Minuten voran, von der das Perfusat der letzten 10 Minuten als „Vorlauf“ gesammelt wurden. Ebenso wurden nach dem Ausschalten für weitere 10 Minuten Proben gesammelt („Nachlauf“).

2.5.2 Endogene Opiode

2.5.2.1 Versuche mit endogenen Opioiden

Ein weiteres Versuchsschema wurde zur Untersuchung inhibitorisch-regulativer Einflüsse von Endomorphin, β -Endomorphin, Dynorphin und Nociceptin auf die Ghrelinsekretion im Magen angewandt. Da bei niedriger Ghrelinsekretionsrate unter unstimulierten Bedingungen relevante inhibitorische Effekte verdeckt sein könnten, wurden die Hormone unter einer elektrischen Vorstimulation mit 10 Hz appliziert. Dabei wurde, wie in Abbildung 2 dargestellt, das Hormon 20 Minuten innerhalb einer insgesamt 40 minütigen

Stimulationsphase infundiert, der eine Basalperiode von jeweils 10 Minuten voranging und folgte.

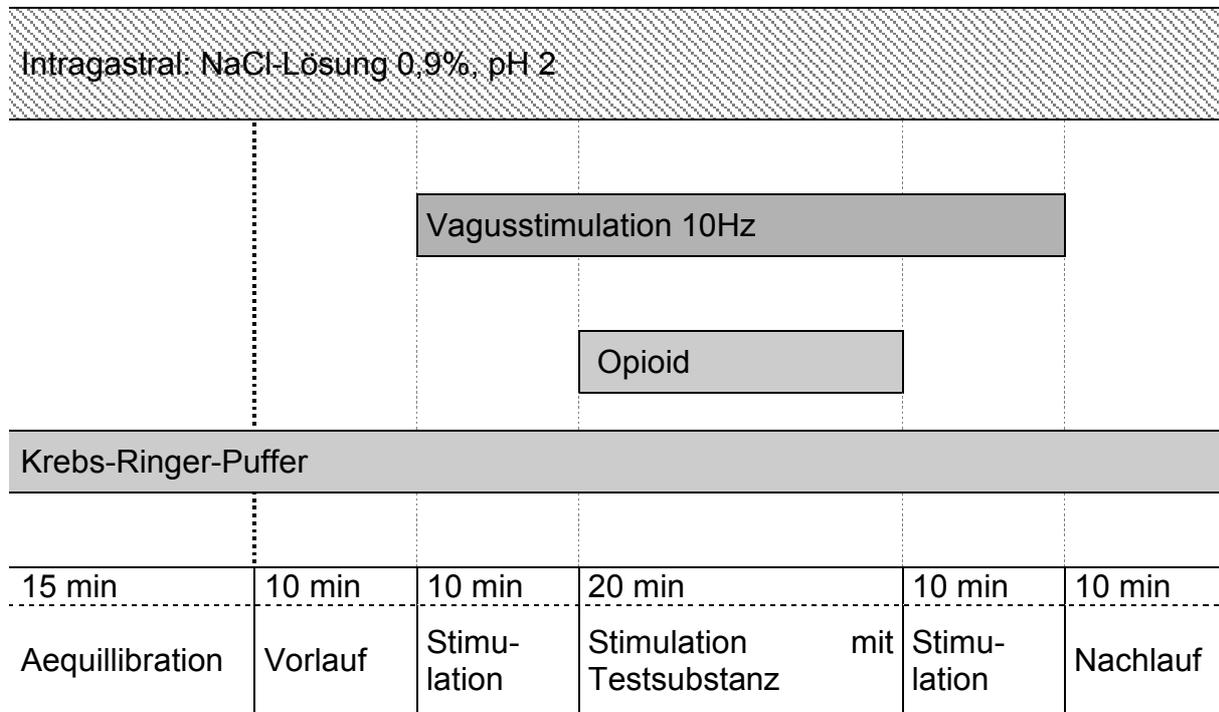


Abbildung 2. Versuchsschema zur Austestung verschiedener gastrointestinaler Hormone unter elektrischer Prästimulation des N. vagus bei 10 Hz. Während des gesamten Versuches wurde vaskulär mit Krebs-Ringer-Puffer und luminal mit einer auf pH 2 titrierten isotonen Natriumchloridlösung perfundiert. Die zu untersuchende Substanz wurde in der entsprechenden Konzentration in Krebs-Ringer-Puffer gelöst und über 20 Minuten der insgesamt 40minütigen Elektrostimulation perfundiert. Dem Beginn der Elektrostimulation ging eine stimulationsfreie Phase von 25 Minuten voran, von der das Perfusat der letzten 10 Minuten als „Vorlauf“ gesammelt wurden. Ebenso wurden nach dem Ausschalten für weitere 10 Minuten Proben gesammelt („Nachlauf“).

2.5.2.2 Versuche unter zusätzlicher Inhibition durch Naloxon

Analog zum Versuchsaufbau der unter 2.5.1. beschriebenen elektrischen Vagusstimulation wurde versucht, den Einfluss einer Blockade der Opioid-Rezeptoren durch Naloxon darzustellen. Der Versuchsablauf erfolgte wie bei den oben beschriebenen Versuchen, unter einer 40 minütigen Infusion der jeweiligen Opioiden in der entsprechenden Konzentration. Gleichzeitig wurde über die gesamte Versuchszeit sowie

während Vor- und Nachlaufphase, Naloxon entweder in der Konzentration 10^{-3} , oder 10^{-6} zugefügt.

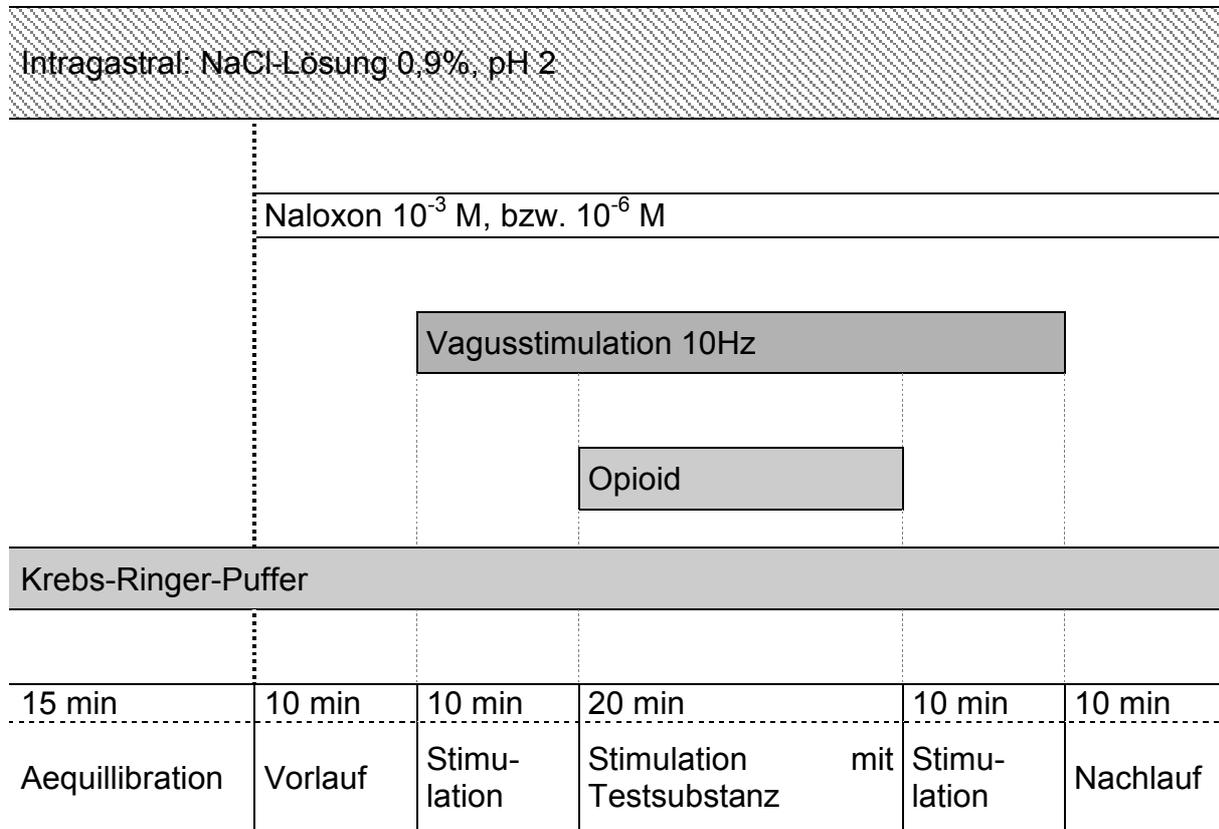


Abbildung 3: Versuchsschema zur Austestung verschiedener gastrointestinaler Hormone unter elektrischer Prästimulation des N. vagus bei 10 Hz und unter Einwirkung von Naloxon in verschiedenen Konzentrationen. Während des gesamten Versuches wurde vaskulär mit Krebs-Ringer-Puffer und luminal mit einer auf pH 2 titrierten isotonen Natriumchloridlösung perfundiert. Die zu untersuchende Substanz wurde in der entsprechenden Konzentration in Krebs-Ringer-Puffer gelöst und über 20 Minuten der insgesamt 40minütigen Elektrostimulation perfundiert. Dem Beginn der Elektrostimulation ging eine stimulationsfreie Phase von 25 Minuten voran, von der das Perfusat der letzten 10 Minuten als „Vorlauf“ gesammelt wurden. Ebenso wurden nach dem Ausschalten für weitere 10 Minuten Proben gesammelt („Nachlauf“). Während der gesamten Versuchzeit, abzüglich der Äquillibrations-Phase wurde Naloxon in verschiedenen Konzentrationen zugefügt.

2.6 Auswertung

2.6.1 Radioimmunoassay

Die Bestimmung der Ghrelinkonzentration in den Proben erfolgte radioimmunologisch auf Grundlage der erstmals 1960 von Yalow und Berson (Yalow et al, 1960) beschriebenen Technik. Das Prinzip des Radioimmunoassays besteht darin, dass das in einer Probe in unbekannter Konzentration enthaltene Antigen mit einem zugesetzten, radioaktiv markierten Antigen, dem sogenannten „Tracer“ um Bindungsstellen eines spezifischen Antikörpers, der im Unterschluß vorliegt, konkurriert. Da die Antigen-Antikörper-Bindung reversibel ist, stellt sie chemisch gesehen eine Gleichgewichtsreaktion dar, so dass sich nach einer Inkubationszeit das Verhältnis des gebundenen Tracers zu gebundenem unmarkiertem Antigen dem Verhältnis der Konzentrationen entspricht. Nach der Trennung von freiem und gebundenem Antigen mittels Immunpräzipitation oder Adsorption an Aktivkohle mit anschließender Zentrifugation und Dekantierung, kann im Szintillations-Gamma-Zähler die Radioaktivität der Probe gemessen werden, die mit der Konzentration des zu bestimmenden Peptids korreliert. Durch Messung verschiedener bekannter Konzentrationen des Peptids in einer Standardverdünnungsreihe, kann ein Faktor für die Umrechnung von Gamma-Zählern in Peptidkonzentration ermittelt werden.

2.6.2 Ghrelinbestimmung

Die Ghrelinkonzentration wurde in jeder zweiten Probe bestimmt. Dazu wurde ein im Handel erhältliches Ghrelin Radioimmunoassay Kit (Phoenix Pharmaceuticals, USA) verwendet. Entsprechend den Anweisungen des Herstellers wurde den mit Ghrelinantikörpern vom Kaninchen inkubierten Proben nach 24 Stunden mit ¹²⁵I markiertes Rattenghrelin als Tracer zugesetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde der zweite Antikörper und Schafserum zugesetzt, um die Antikörper auszufällen. Nach Zentrifugierung und Absaugen erfolgte die automatisierte Messung im Gamma-Zähler. Die Sensitivität des Assays lag bei 1-128 pg/ml. Der Variationskoeffizient zwischen den Substanzen mit dem Antikörper wurde durch regelmäßige Mitbestimmung in verschiedenen Konzentrationen ausgeschlossen.

2.6.3 Statistik

Die Ergebnisse des Radioimmunoassays wurden im Statistikprogramm Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) erfasst und in Mittelwerte umgerechnet. Die Abweichung der Einzelmessungen vom Mittelwert wurden als Standardabweichung der Mittelwerte („standard error of the mean“, SEM) angegeben. Zur weiteren statistischen Analyse wurde das Programm Jandel SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) eingesetzt. Die Daten wurden mittels t-Test für verbundene Werte geprüft und die relativen Veränderungen bei der vagalen Stimulation durch Varianzanalyse multipler Determinanten. Das Ergebnis wurde als signifikant erachtet, wenn $p \leq 0,05$ war. Zur graphischen Darstellung wurde das Programm Jandel SigmaPlot (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) sowie das Programm Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Vagusstimulation

Die vagale Stimulation mit 10 Hz, 10 Volt und einem Intervall von 1ms induziert einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) der Ghrelinfreisetzung (Lippl, Kircher et al. 2004). Dieses Ergebnis ist bereits bekannt. Der Versuch wurde durchgeführt, um die Funktionstüchtigkeit des Systems nachzuweisen.

3.2 Effekte endogener Opiode auf die vagal stimulierte Ghrelinfreisetzung

Für die Versuche mit endogenen Opioiden musste gemäß Versuchsprotokoll zunächst sichergestellt werden, dass durch die elektrische Vagusstimulation (10 Hz, 10 V, 1 ms) die Ghrelinsekretion auch über einen Zeitraum von 40 Minuten auf einem konstant erhöhten Niveau gehalten werden kann.

Die Experimente fanden unter elektrischer Vorstimulation mit 10 Hz bei einem intraluminalen pH-Wert von 2, der dem physiologischerweise in der postprandialen und interdigestiven Phase vorherrschendem pH entspricht, statt.

3.2.1 Endomorphine

Die intravaskuläre Applikation von Endomorphin zeigte in einer Konzentration von 10^{-8} M einen deutlichen, aber nicht signifikanten Abfall der Ghrelinfreisetzung von $147 \text{ pg/min} \pm 85$ auf $60 \text{ pg/min} \pm 32$ ($n=6$). In einer Verdünnung auf 10^{-10} ($n=3$) ließ sich kein eindeutiger Trend mehr feststellen.

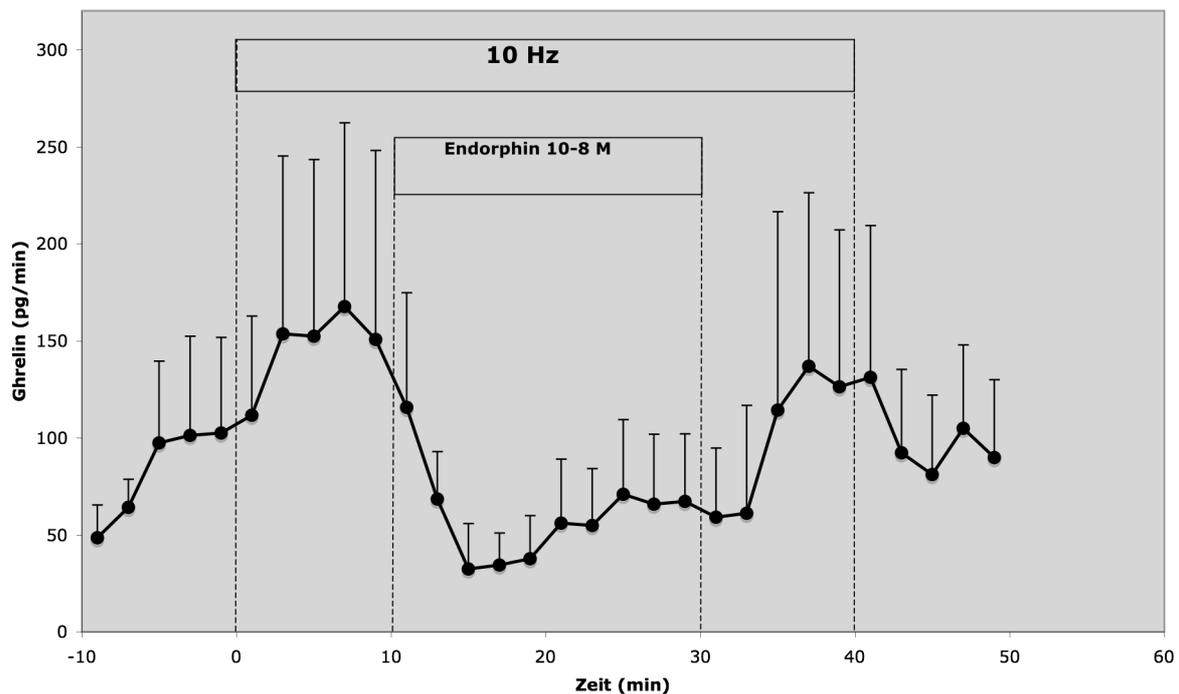


Abbildung 4: Effekte der *in vitro*-Endomorphinapplikation (10^{-8} M) auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens (10 Hz, intragastraler pH = 2) (Mittelwert \pm SEM). ($n=6$)

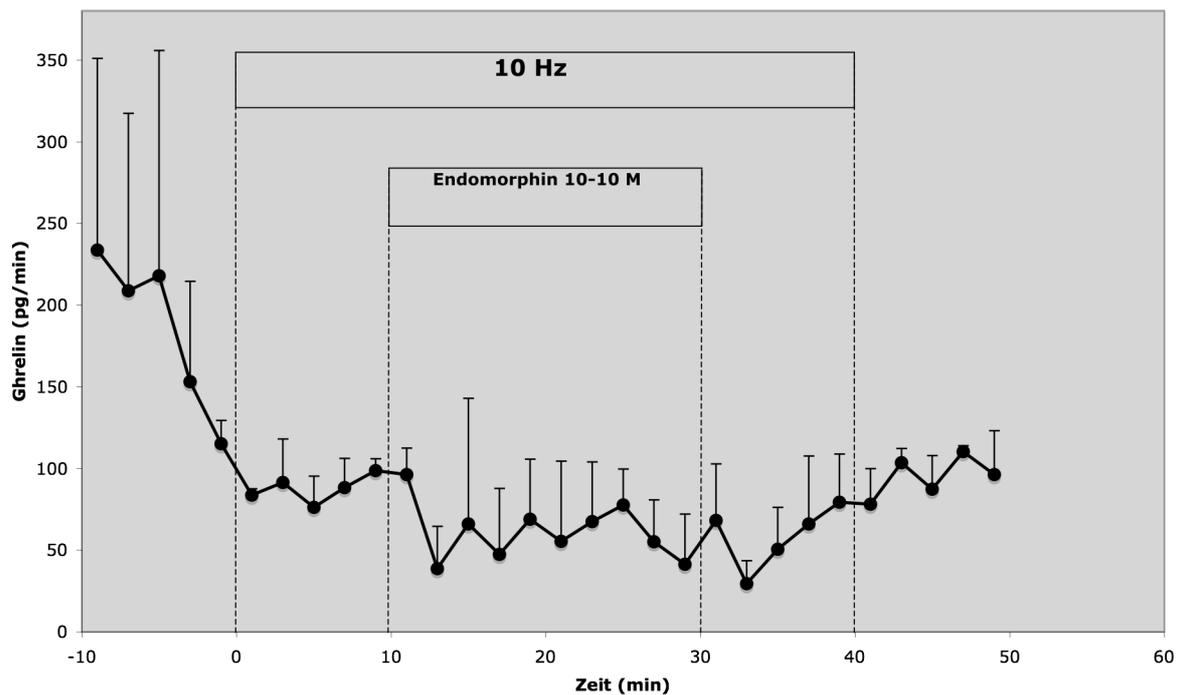


Abbildung 5: Effekte der *in vitro*-Endomorphinapplikation ($10^{-10}M$) auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens (10 Hz, intragastraler pH = 2) (Mittelwert \pm SEM). (n=3)

3.2.2 β -Endorphin

Die Infusion von β -Endorphin unter vagaler Vorstimulation zeigte in einer Konzentration von 10^{-7} (n=12) einen Trend zur Inhibition der Ghrelinausschüttung. In einer Verdünnung auf 10^{-9} M (n=12) oder 10^{-10} M (n=8) war kein Effekt auf die Ghrelinausschüttung nachzuweisen.

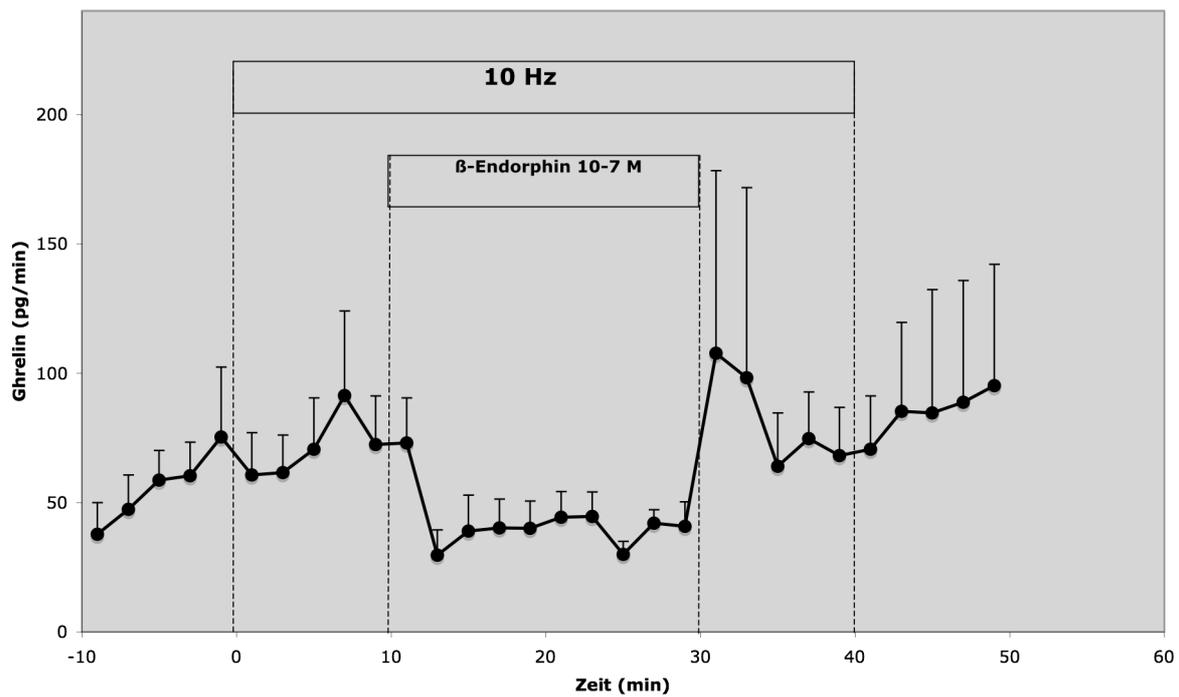


Abbildung 6: Effekte der *in vitro*- β -Endomorphinapplikation (10^{-7} M) auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens (10 Hz, intragastraler pH = 2) (Mittelwert \pm SEM). (n=12)

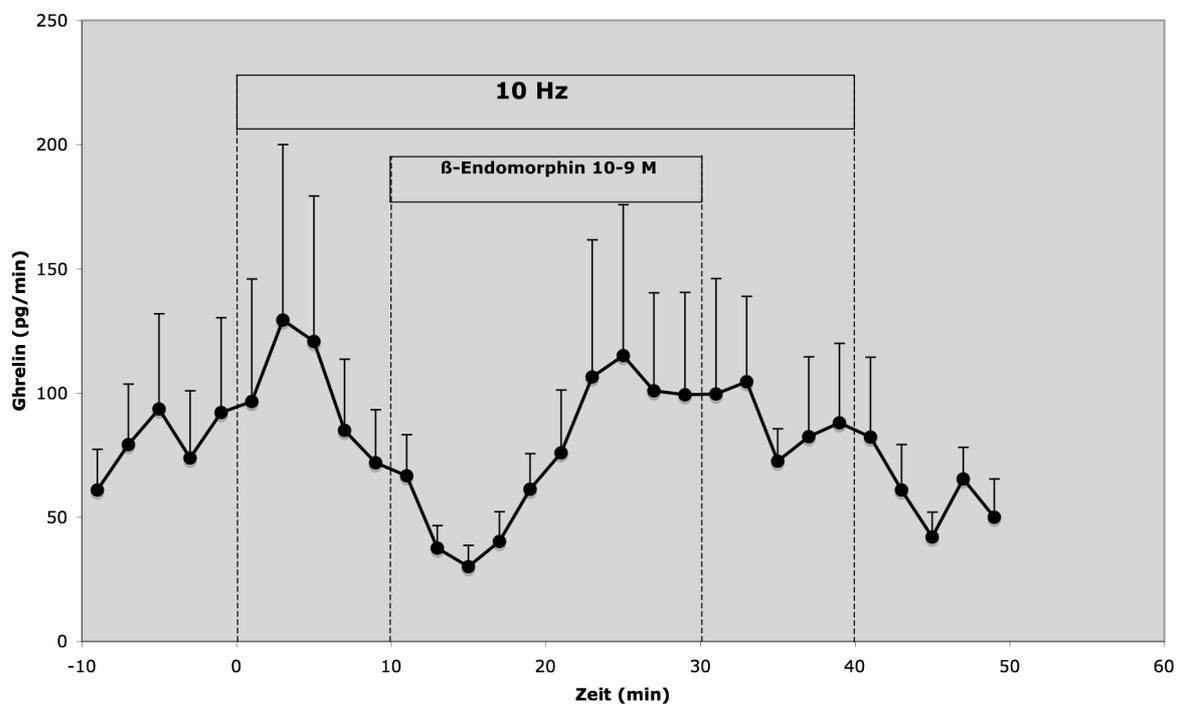


Abbildung 7: Effekte der *in vitro*- β -Endomorphinapplikation (10^{-9} M) auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens (10 Hz, intragastraler pH = 2) (Mittelwert \pm SEM). (n=12)

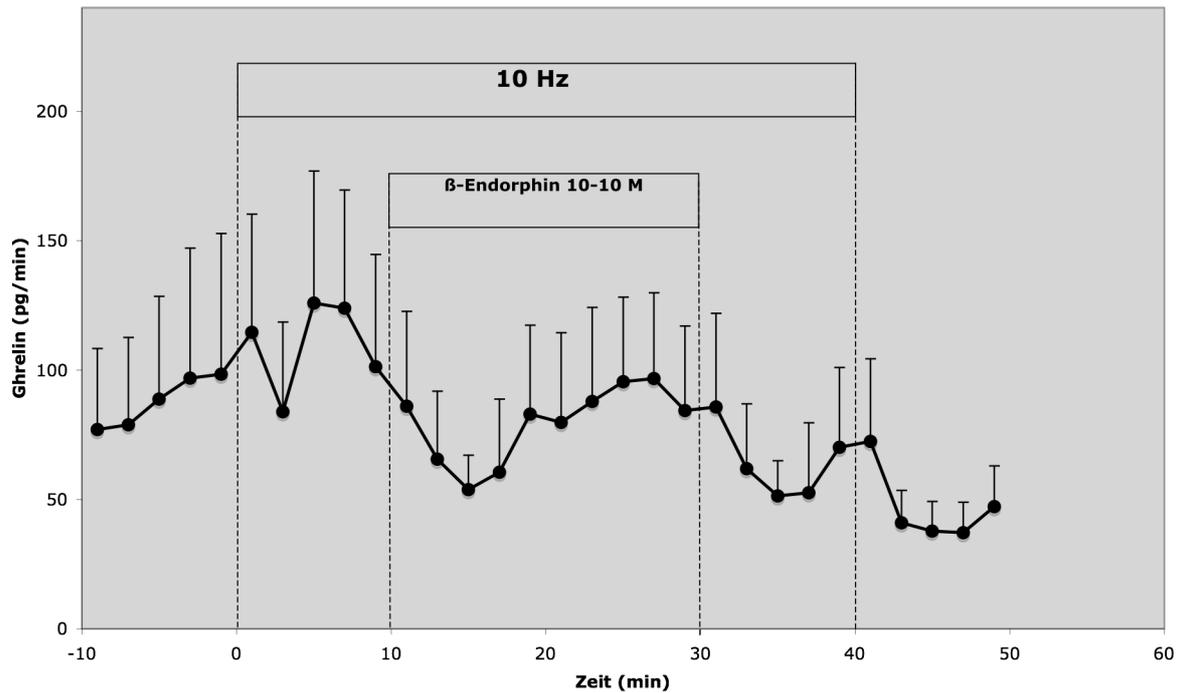


Abbildung 8: Effekte der *in vitro*- β -Endomorphinapplikation (10^{-10} M) auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens (10 Hz, intragastraler pH = 2) (Mittelwert \pm SEM). (n=8)

Bei Versuchen ohne Vagusvorstimulation war weder in einer Konzentration von 10^{-7} M (n=2) noch in 10^{-9} M (N=4) ein Effekt auf die Ghrelinausschüttung vorhanden.

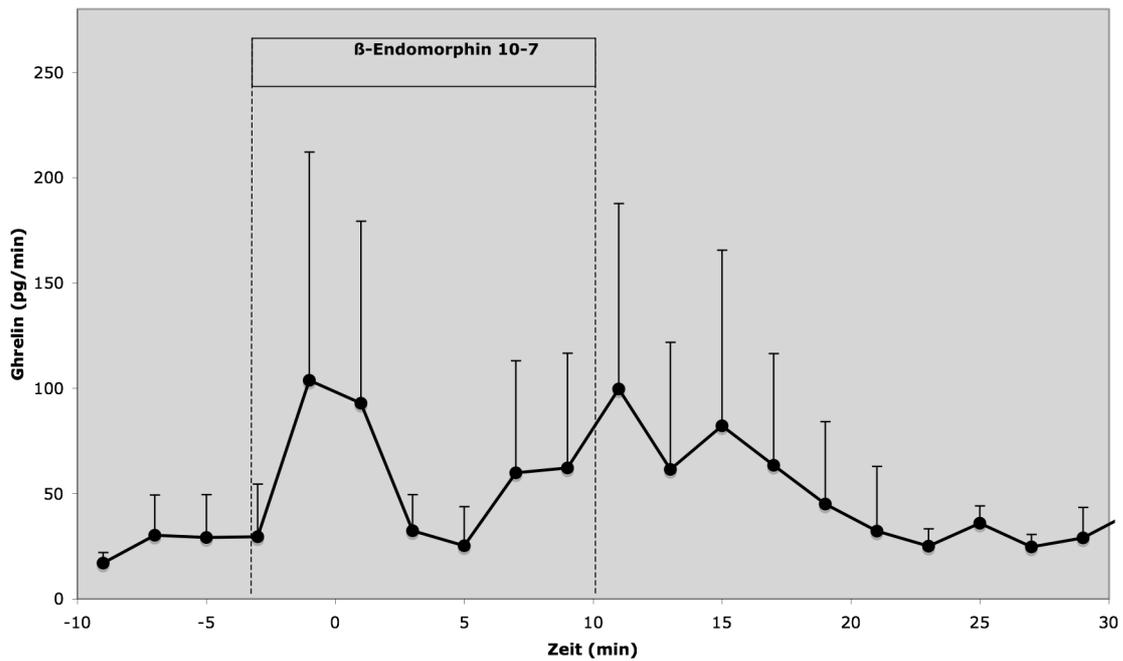


Abbildung 9: Effekte der *in vitro*- β -Endomorphinapplikation ($10^{-7} M$) auf die Ghrelinfreisetzung ohne Vagusstimulation (intraogastraler pH = 2) (Mittelwert \pm SEM). (n=2)

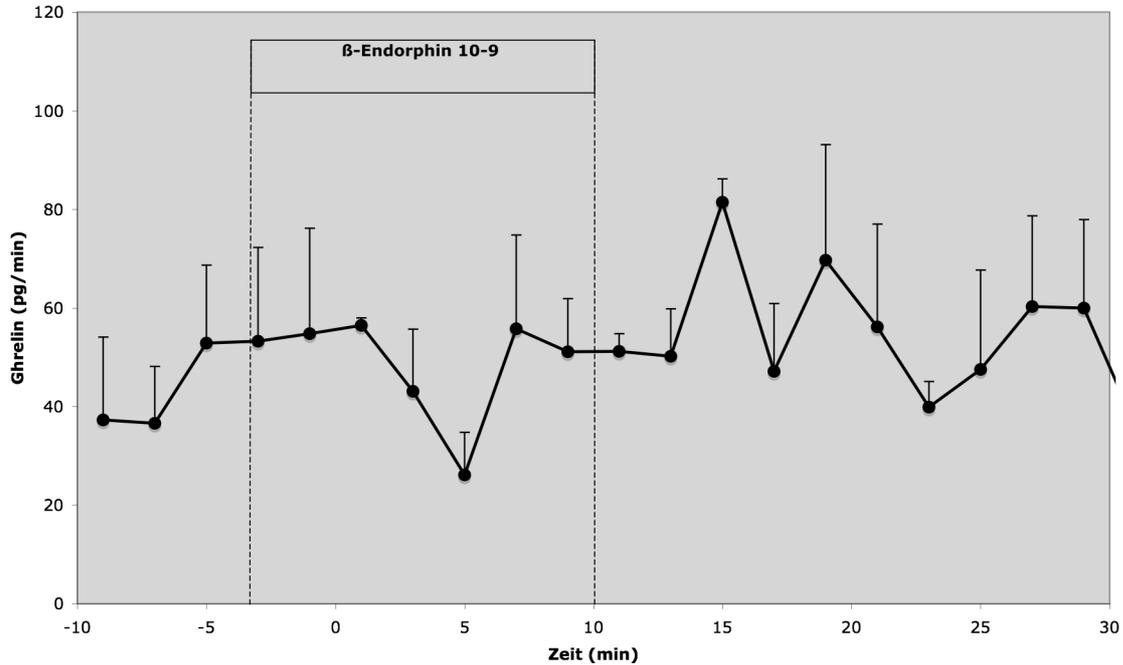


Abbildung 10: Effekte der *in vitro*- β -Endomorphinapplikation ($10^{-9} M$) auf die Ghrelinfreisetzung ohne Vagusstimulation (intraogastraler pH = 2) (Mittelwert \pm SEM). (n=4)

3.2.3 Nociceptin

Die intravasale Applikation von Nociceptin in einer Konzentration von 10^{-7} M (n=9) und 10^{-9} M (n=6) zeigte keine signifikanten Auswirkungen auf die Ghrelinsekretion.

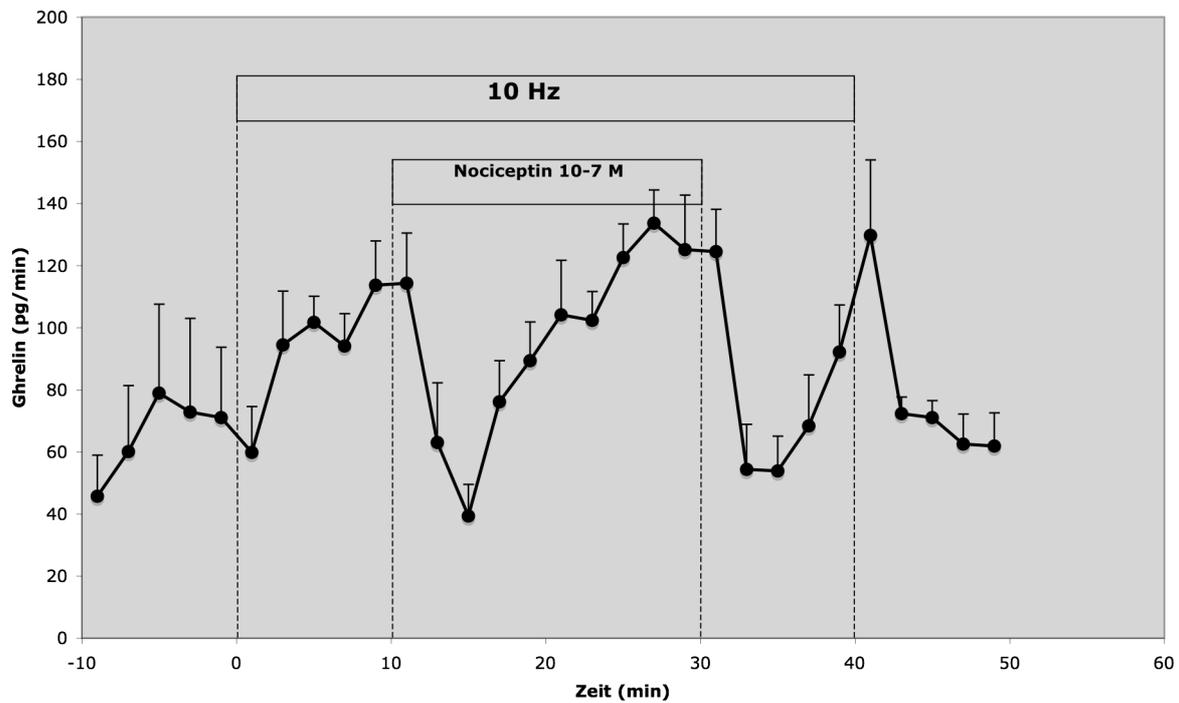


Abbildung 11: Effekte der *in vitro*-Nociceptinapplikation (10^{-7} M) auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens (10 Hz, intragastraler pH = 2) (Mittelwert \pm SEM). (n=9)

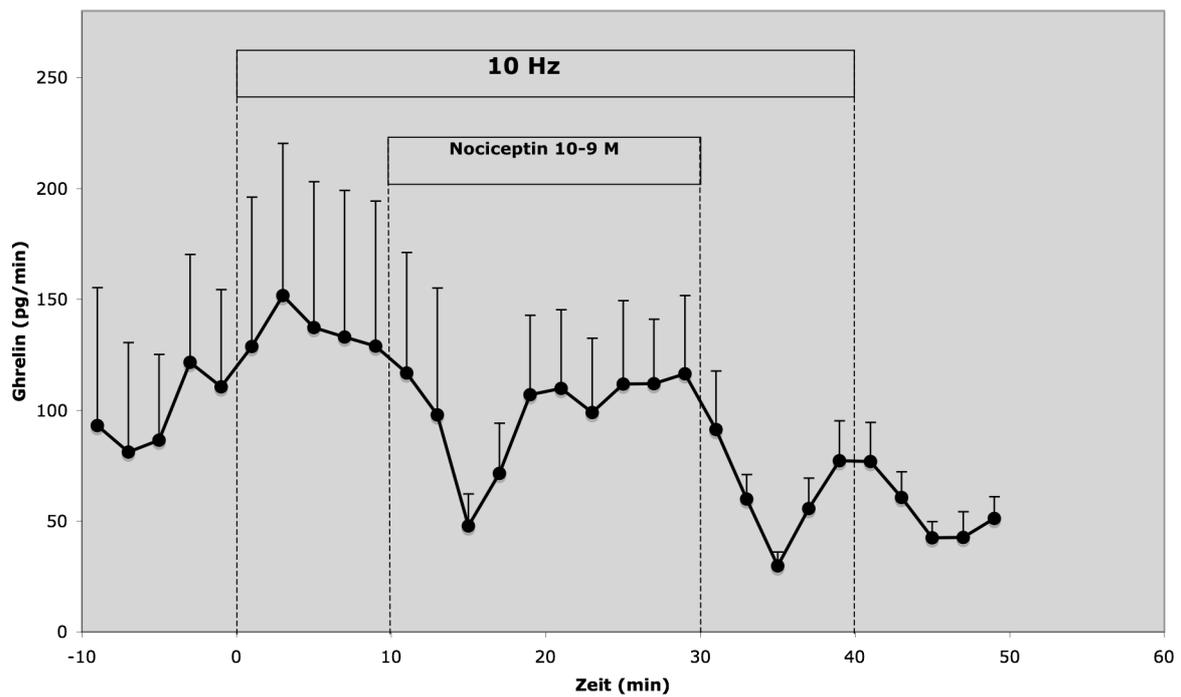


Abbildung 12: Effekte der *in vitro*-Nociceptinapplikation ($10^{-9}M$) auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens (10 Hz, intragastraler pH = 2) (Mittelwert \pm SEM). (n=6)

3.2.4 Dynorphin

Bei der Applikation von Dynorphin zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Ghrelinsekretion. In der Konzentration von 10^{-7} M ($n=8$) zeigt sich allerdings ein inhibierender Trend, der in einer Konzentration von 10^{-9} M ($n=9$) nicht mehr nachweisbar war.

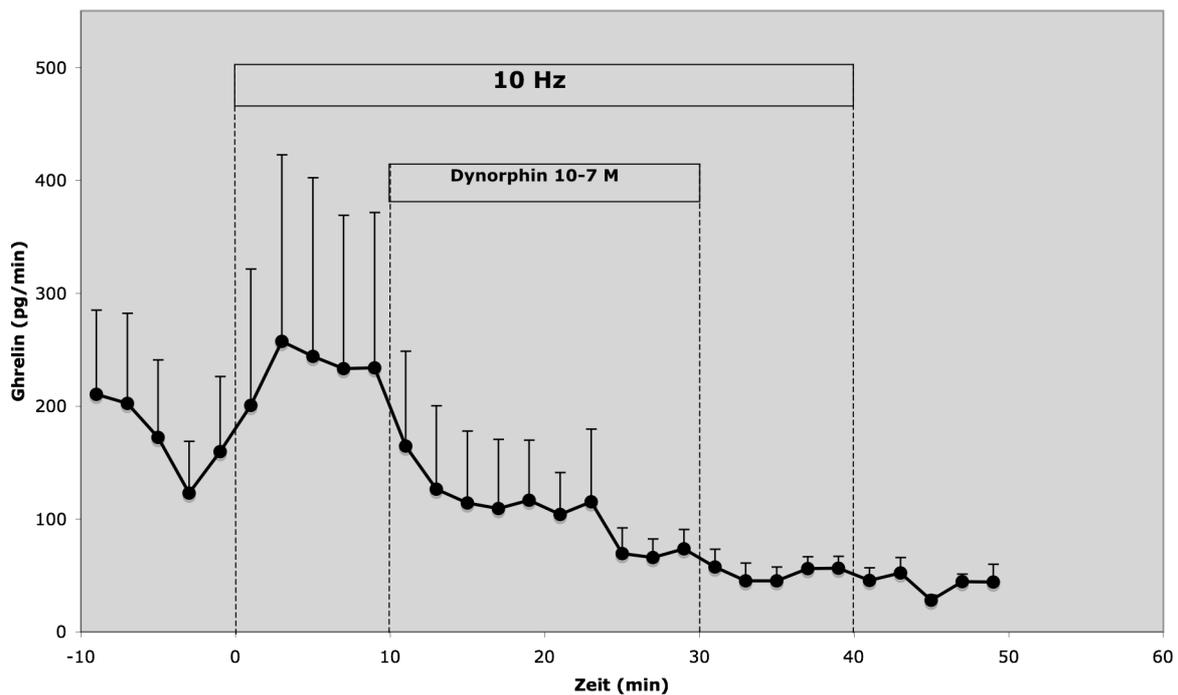


Abbildung 13: Effekte der *in vitro*-Dynorphinapplikation (10^{-7} M) auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens (10 Hz, intragastraler pH = 2) (Mittelwert \pm SEM). ($n=8$)

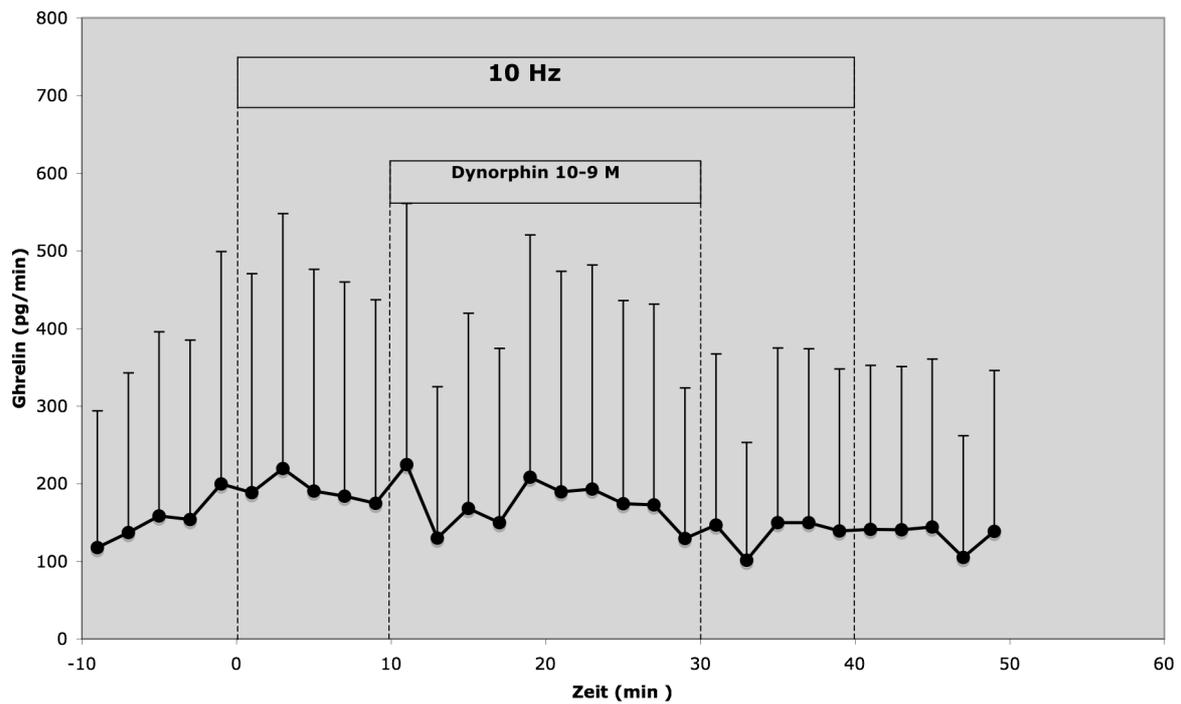


Abbildung 14: Effekte der *in vitro*-Dynorphinapplikation ($10^{-9}M$) auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens (10 Hz, intragastraler pH = 2) (Mittelwert \pm SEM). (n=9)

Bei Versuchen ohne vagale Vorstimulation war weder in einer Konzentration von $10^{-7} M$ (n=5), noch in $10^{-9} M$ (n=5) ein Effekt auf die Ghrelinausschüttung vorhanden.

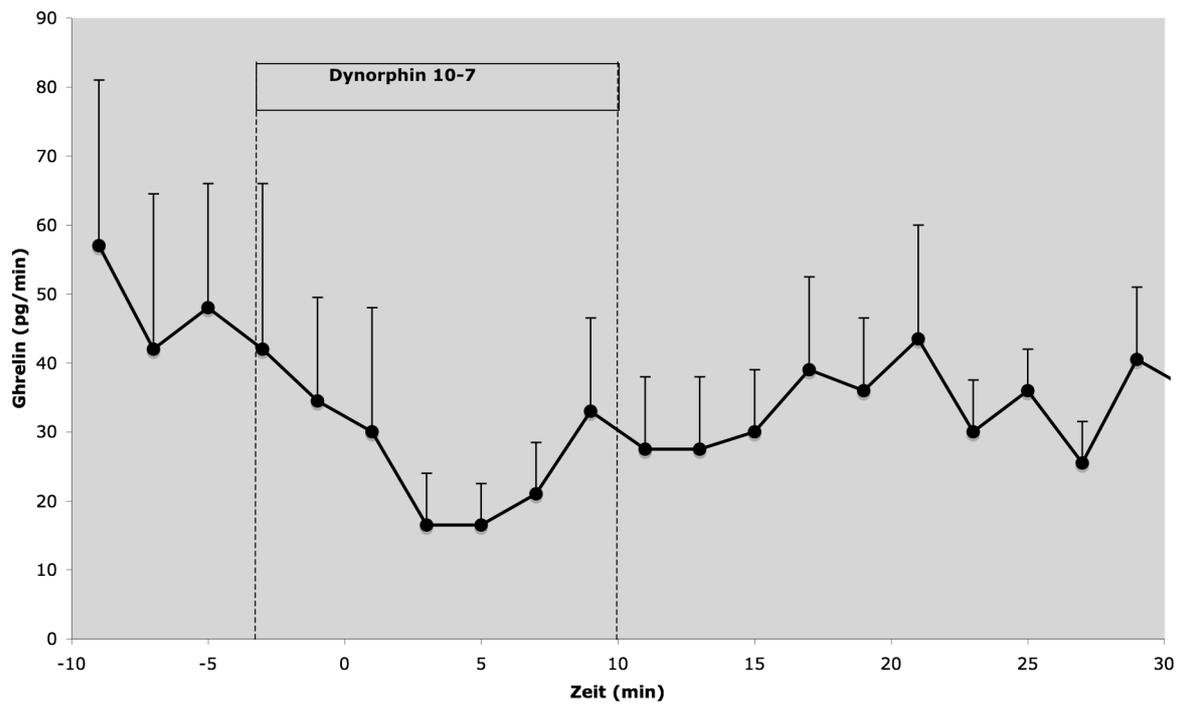


Abbildung 15: Effekte der *in vitro*- Dynorphinapplikation ($10^{-7}M$) auf die Ghrelinfreisetzung ohne Vagusstimulation (intrastraler pH = 2) (Mittelwert \pm SEM). ($n=5$)

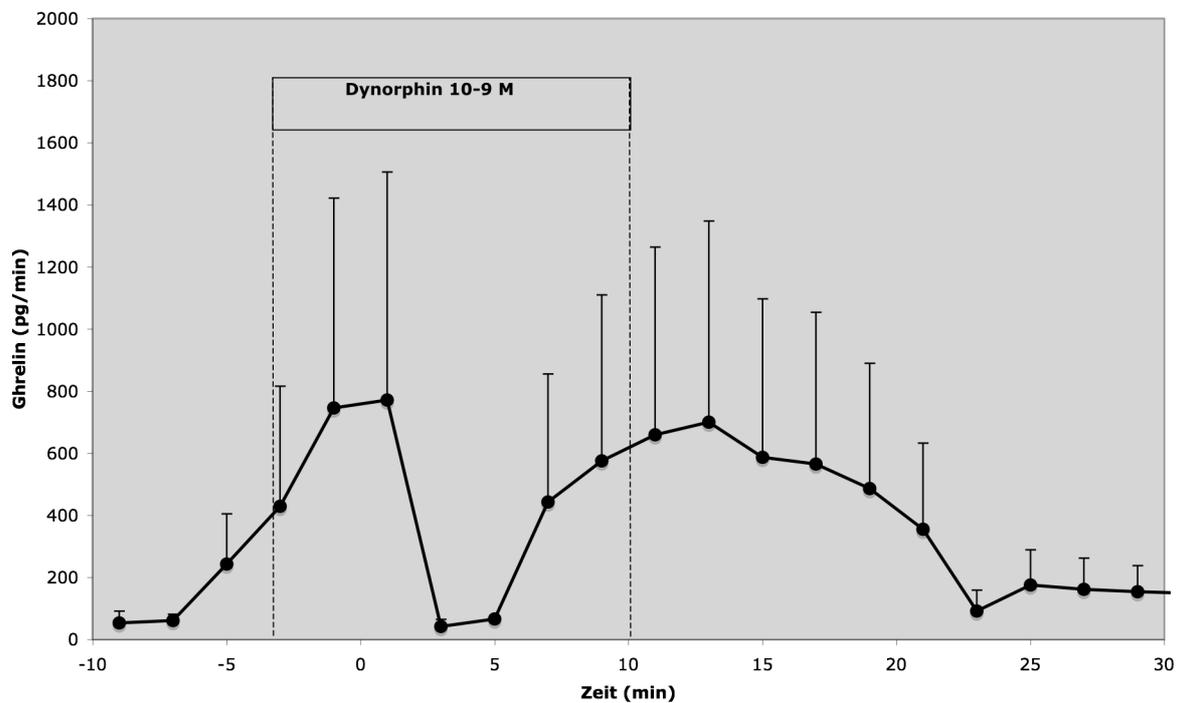


Abbildung 16: Effekte der *in vitro*- Dynorphinapplikation ($10^{-9}M$) auf die Ghrelinfreisetzung ohne Vagusstimulation (intrastraler pH = 2) (Mittelwert \pm SEM). ($n=5$)

3.3 Versuche mit Naloxon

3.3.1 Einfluss von Naloxon auf die Ghrelinsekretion

Bei den Versuchen mit den Opioidantagonisten am vagal vorstimulierten Magen zeigte sich keine Reaktion der Ghrelinsekretion auf eine Applikation mit der Konzentration 10^{-5} M ($n=3$).

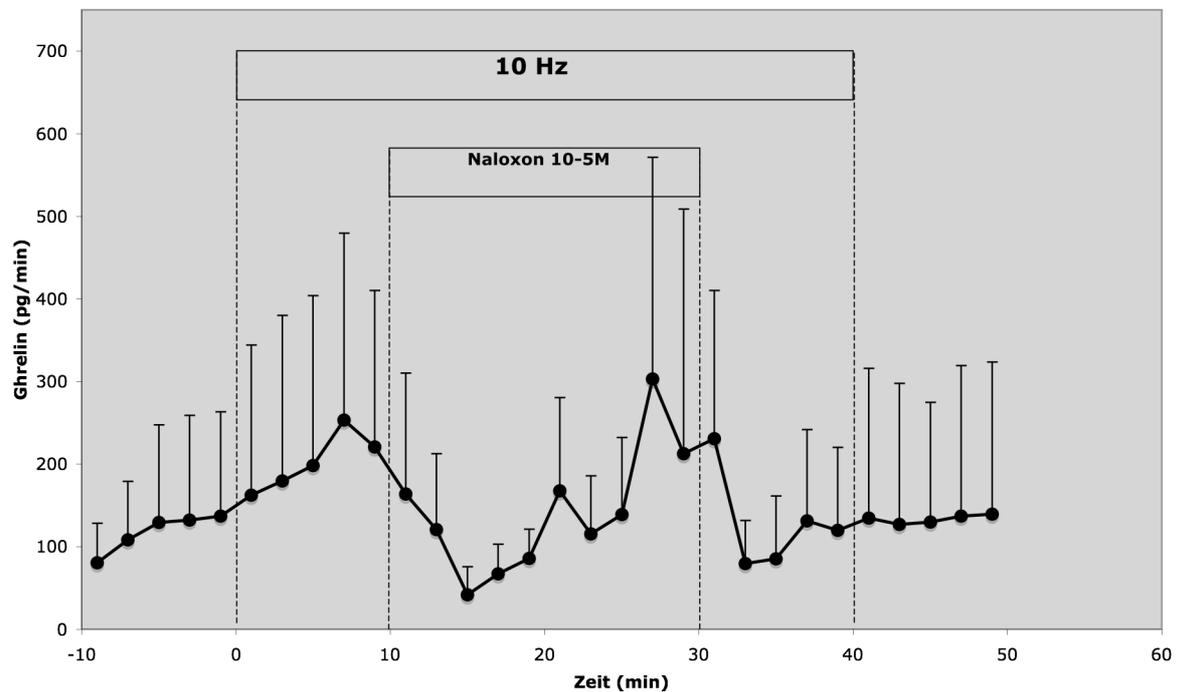


Abbildung 17: Effekte der *in vitro*-Naloxon-applikation (10^{-5} M) auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens (10 Hz, intragastraler pH = 2) (Mittelwert \pm SEM). ($n=3$)

3.3.2 Einfluss bei simultaner Gabe von Endomorphinen

Bei diesen Versuchen, wurde während des gesamten Versuches Naloxon in einer Konzentration von 10^{-6} M infundiert. Nach 10 minütiger Vagusstimulation wurde Endomorphin in einer Konzentration von 10^{-8} M zugegeben. Es zeigten sich keine signifikanten Änderungen der Ghrelinsekretion. (n=4)

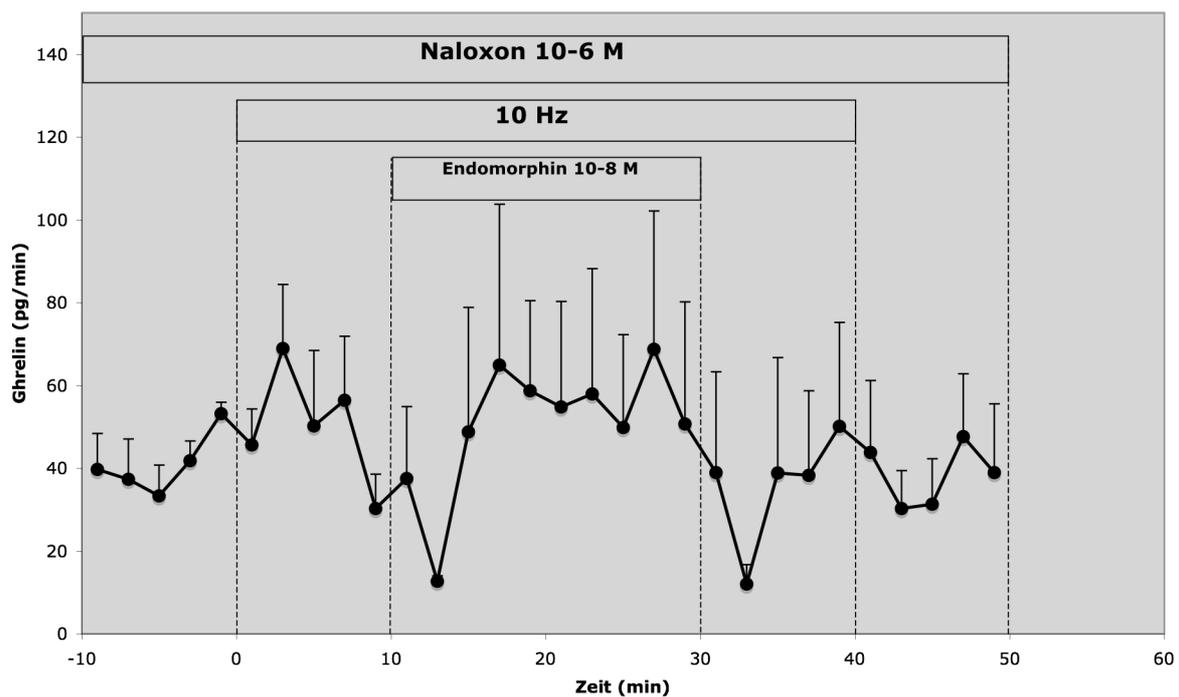


Abbildung 18: Effekte der *in vitro*-Naloxonapplikation (10^{-6} M) über den gesamten Versuchsaufbau und gleichzeitiger Applikation von Endomorphin (10^{-8} M) über zwanzig Minuten auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens (10 Hz, intragastraler pH = 2) (Mittelwert +/- SEM). (n=4)

4. Allgemeine Diskussion

4.1 Ghrelin

4.1.1 Die Growth- Hormone-Secretagogues – Entdeckung des Ghrelins

1976 entdeckten C.Y.Bowers und Mitarbeiter einige Opioid-Peptid-Abkömmlinge, die nur geringe Opioid-Wirkungen hatten, stattdessen aber schwache GH-releasing Aktivitäten zeigten und bezeichneten sie als GHSs (Bowers, Momany et al. 1980; Deghenghi 1997). Die Struktur des ersten GHS, einem Methionin-Enkephalin-Derivat, ist: Tyr- D- Trp- Gly- Phe- Met- NH₂. Es induziert die GH-Ausschüttung durch direkte Wirkung an der Hypophyse. Die GH-releasing Aktivität der frühen GHSs ist sehr schwach und nur in vitro beobachtet, was zur Suche nach weiteren, wirkungsstärkeren GHSs führte.

1984 wurde mit dem Hexapeptid GHRP-6, das bis dahin stärkste GHS synthetisiert (Bowers, Momany et al. 1984). Seine Wirkung ist sowohl in vitro als auch in vivo nachweisbar (Argente, Garcia-Segura et al. 1996; Ghigo, Arvat et al. 1998; Micic, Casabiell et al. 1999). 1993 folgten die ersten nicht-peptidischen GHSs, die unter anderem von R.G.Smith und Mitarbeitern synthetisiert wurden (Cheng, Chan et al. 1993; Smith, Cheng et al. 1993). Das bekannteste unter ihnen ist MK-0677 (Spiroindolin L-163,191). Es zeichnet sich durch eine hohe Bioverfügbarkeit aus. Zudem zeigt es auch bei oraler Applikation genügend Wirkung und konnte so in klinischen Studien eingesetzt werden.

Wie die GHSs die GH-Ausschüttung in der Hypophyse stimulieren war lange nicht bekannt. Während GHRH am GHRH-Rezeptor über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP wirkt, stellte sich bei Experimenten heraus, dass die GHSs an einen anderen Rezeptor binden und dort die intrazelluläre Kalziumkonzentration über den Inositol-1,4,5-

Triphosphat-Signal-Transduktions-Weg erhöhen (Cheng, Chan et al. 1989; Blake and Smith 1991; Cheng, Chan et al. 1991; Popovic, Micic et al. 1996).

Der GHS-Rezeptor (GHS-R) wurde 1996 indentifiziert. Er ist ein typischer G-Proteingekoppelter Rezeptor (GPCR), der in der Hypophyse, dem Hypothalamus und dem Hippocampus exprimiert wird (Howard, Feighner et al. 1996; Bennett, Thomas et al. 1997; Guan, Yu et al. 1997).

Er galt lange Zeit als „orphan receptor“, da sein natürlicher Ligand, das Ghrelin, nicht bekannt war und erst 1999 von Kojima et al. entdeckt wurde (Kojima, Hosoda et al. 1999). Der Name Ghrelin basiert auf „ghre“, der proto-indo-europäischen Wurzel für „wachsen“, in Bezug auf die Fähigkeit, die GH-Ausschüttung zu stimulieren. Zur gleichen Zeit wie Kojima entdeckten Tomasetto et al. aus sekretorischen Granula endokriner Zellen des Mausmagens ein Protein, das sie aufgrund der großen Ähnlichkeit zu Prepromotilil „motilin related peptide“ nannten (Tomasetto, Karam et al. 2000) und das sich als dasselbe Peptid herausstellte.

4.1.2 Struktur und Prozessierung des Ghrelins

Ghrelin ist ein aus 28 Aminosäuren bestehendes Peptid. Das Ghrelin der Ratte und das des Menschen unterscheidet sich nur in zwei Aminosäuren (Kojima, Hosoda et al. 1999). Der genetische Code wurde also über die Jahrhunderte konserviert, was für eine große funktionelle Bedeutung des Ghrelins spricht. Es existiert keine strukturelle Homologie zwischen Ghrelin und den synthetischen Peptid-GHSs, wie GHRP-6 oder Hexarelin.

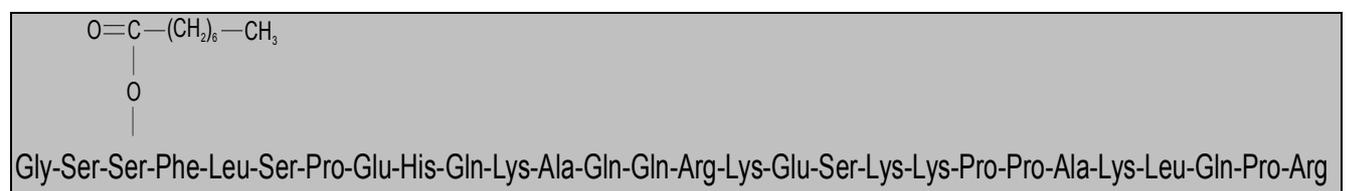


Abbildung 19: Strukturformel des Ghrelins

Das menschliche Ghrelin-Gen ist auf dem Chromosom 3p25-26 lokalisiert (Smith, Van der Ploeg et al. 1997). Es umfasst 5 Exons (Tanaka, Hayashida et al. 2001; Kanamoto, Akamizu et al. 2004) und besitzt zwei verschiedene Initiationsstellen für die Transkription,

aus denen, je nach Splicing-Mechanismus, zwei verschiedene mRNA-Transkripte entstehen. Eines kodiert für den Ghrelin-Precursor, das andere für den des-Gln14-Ghrelin-Precursor (s.u.) (Hosoda, Kojima et al. 2000).

Das Precursor-Protein Preproghrelin besteht aus 117 Aminosäuren (Kojima, Kangawa et al. 2005). Aus ihm entsteht das 94-Aminosäure lange Proghrelin mit einem n-terminalen Glycin-Rest und aus diesem, das reife, 28-Aminosäure lange Ghrelin (Zhu, Cao et al. 2006).

Ghrelin ist das N-terminale Fragment, das aus Proghrelin generiert wird. Das C-terminale Fragment wird Obestatin genannt. Bis heute gibt es keinen sicheren Hinweis darauf, dass Obestatin eine Rolle bei der Energiebilanz spielt (Noguieras, Pfluger et al. 2007; Chartel, Alvear-Perez et al. 2007; Gourcerol, Coskun et al. 2007), auch wenn ein anorexigener Effekt vermutet wird (Zhang, Ren et al. 2005).

Ghrelin wird posttranslational an seiner N-terminalen Position 3 (Serin) durch eine n-Oktanylierung modifiziert (Kojima, Hosoda et al. 1999). Diese Modifikation ist bisher einzigartig und essentiell für die biologische Aktivität des Ghrelins, da es erst durch sie an den GHS-R1a-Rezeptor binden kann (Kojima, Hosoda et al. 1999; Bednarek, Feighner et al. 2000; Matsumoto, Kitajima et al. 2001).

Die normale Plasmakonzentration des Ghrelins bei normalgewichtigen Erwachsenen beträgt 10-20 fmol/ml (für n-octanyl-Ghrelin), bzw. 100-150 fmol/ml (Gesamtghrelin). 90% des zirkulierenden Ghrelins ist folglich nicht-acyliertes Ghrelin (Yoshimoto, Mori et al. 2002; Hosoda, Kojima et al. 2000).

Die unacylierte Form des Ghrelins ist zwar im Plasma in einer höheren Konzentration vorhanden, die meisten biologischen Aktivitäten werden aber durch die acylierte Form ausgeführt, insbesondere die Stimulation der Nahrungsaufnahme (van der Lely, Tschöp et al. 2004).

Das Enzym, das für diese Oktanylierung des Ghrelins zuständig ist, wurde erst 2008 identifiziert und genauer charakterisiert (Gutierrez, Solenberg et al. 2008; Yang, Brown et al. 2008). Die Ghrelin-O-Acyltransferase (GOAT) wird auch membrane bound O-acyltransferase (MBOAT) genannt. Ghrelin ist ihr einziges Substrat und sie scheint das einzige Enzym zu sein, das die Acylierung des Proghrelin katalysiert (Gutierrez, Solenberg et al. 2008; Yang, Brown et al. 2008; Kirchner, Gutierrez et al. 2009; Yang, Zao et al. 2008).

Die Regulierung der GOAT ist noch nicht vollständig verstanden. Neue Studien zeigen, dass die Acylierung des Ghrelins vom Vorhandensein spezifischer Nahrungslipide als Acylierungssubstrate abhängig ist. Über diesen Mechanismus informiert das Ghrelin-GOAT-System das Gehirn über die verfügbaren Kalorien (Kirchner, Gutierrez et al, 2009). Durch langes Fasten wird die Menge des acylierten Ghrelins vermindert, das totale Gesamtghrelin bleibt durch die steigende Konzentration des unacylierten Ghrelins aber gleich (Liu, Prudom et al. 2008). Langes Fasten reguliert folglich die Ghrelinaktivität durch Inhibition der Acylierung, die Synthese des Ghrelins bleibt unverändert. Das erklärt auch, warum erhöhter Hunger nur nach kurzem Fasten auftritt (Toschinai, Mondal et al. 2001).

4.1.3. Ghrelinderivate

4.1.3.1 Allgemein

Während der Erforschung des humanen Ghrelins wurden auch andere Unterformen des Peptids entdeckt, die, je nach Anzahl der Aminosäuren bzw. der Alkylierung am Ser3 in weitere Gruppen unterteilt wurden (Hosoda, Kojima et al. 2003). Das klassische Ghrelin besteht aus 28 Aminosäuren. Wird bei der enzymatischen C-terminalen Prozessierung auch das Arginin entfernt, entsteht ein Derivat mit 27 Aminosäuren, seine C-terminale Aminosäure bildet das Prolin (Ghrelin [27]). Weitere Derivate entstehen, wenn die Acylierung des Serins an Position 3 nicht mit Octansäure, sondern mit Dekansäure erfolgt. Die Fähigkeit dieser Derivate, die GH-Freisetzung zu stimulieren ist äquivalent zu der des normalen Ghrelins.

(1-27) Ghreline	(1-28) Ghreline
Oktanoyl ghrelin	Oktanoyl ghrelin (1-27)
Dekanoyl ghrelin	Dekanoyl ghrelin (1-27)
Decenoyl ghrelin	
Des-acyl ghrelin	Des-acyl ghrelin (1-27)

Tabelle 2: Übersicht über die beim Menschen nachgewiesenen Ghrelinderivate

4.1.3.2 Des-Acyl-Ghrelin

Fehlt diese typische Alkylierung, geht, wie bereits erwähnt die Fähigkeit der Bindung an den GHS-R1a-Rezeptor verloren (Hosoda H, Kojima et al. 2002). Anfangs bestand deshalb die These, die sogenannten des-acyl-Ghrelins seien ohne biologische Aktivität. Zumindest im kardiovaskulären System haben Baldanzi et al. aber gezeigt, dass in vitro eine Wirkung auf Cardiomyozyten und Brustkrebszellen besteht. Da diese Zelllinie den Ghrelin-Rezeptor GHS-R nicht exprimieren (Baldanzi, Filigheddu et al. 2002), müssen die nicht-alkylierten Formen über einen anderen, bisher nicht bekannten Rezeptor wirken.

4.1.4 Produktionsorte des Ghrelins

4.1.4.1 Der Magen und andere gastrointestinale Organe

Ghrelin findet sich bei sämtlichen Wirbeltierarten (z.B. Rind, Schaf, Schwein, Maus, Ratte, Affen, Gerbil) aber auch bei Vögeln, Fischen und Amphibien (Kojiima et al. 2001). Es wird hauptsächlich im Magen produziert (Ariyasu, Takaya et al. 2001). Hier sind die ghrelin-enhaltenden Zellen vor allem in der Mukosa des Fundusbereiches zu finden (Date, Kojima et al. 2000; Tomasetto, Wendling et al. 2001; Yabuki, Ojima et al. 2004).

Im Magen unterscheidet man vier Typen endokriner Zellen, die insgesamt 20% aller Zellen in der Mucosa ausmachen: ECL-, D-, enterochromaffine und X/A-like (bzw. Gr-) Zellen (Davis 1954; Capella, Solcia et al. 1969; Solcia, Capella et al. 1975; Grube and Forssmann 1979). Wobei die ECL-Zellen Histamin und Uroganyllin, die D-Zellen Somatostatin, die EC-Zellen Serotonin und die X/A-like Zellen Ghrelin produzieren. Die X/A-like Zellen sind ca. 10 µm groß und enthalten runde, kompakte Granula, die mit Ghrelin gefüllt sind. Sie machen ca. 20% der endokrinen Zellpopulation in den Belegzellen aus (Date, Kojima et al. 2000; Dornonville de la Cour, Bjorkqvist et al. 2001; Yabuki, Ojima et al. 2004). Nach der Nomenklatur für endokrine Zellen werden sie nun Gr-Zellen genannt.

Sie können mit einem, für die acyl-modifizierte Region des Ghrelins am NH₂-Ende spezifischen Antikörper markiert werden, was zeigt, dass Ghrelin schon in den sekretorischen Granula der X/A-like Zellen acyl-modifiziert wird. Ghrelin-produzierende Zellen sind in der Schleimhaut des Magens, des Duodenums, des Ileums, des Caecums und des Colons zu finden (Date, Kojima et al. 2000; Tomasetto, Wendling et al. 2001; Yabuki, Ojima et al. 2004) .

Während die Gr-Zellen im Magen vor allem am Drüsengrund der Belegzellen liegen und vereinzelt auch im Drüsenhals, sind sie im Rest des Verdauungstraktes in die Epithelien der Krypten und Zotten eingestreut. Bei den Ghrelin-produzierenden Zellen werden zwei verschiedene Typen beschrieben, die sich in Aufbau und Lokalisation unterscheiden. Die Zellen des offenen Typs („open-type cells“), sind dreieckig geformt und reichen mit ihren zytoplasmatischen Fortsätzen bis ins Lumen. Ihre Konzentration ist im Magen am größten und nimmt nach distal hin ab. Die Zellen des geschlossenen Typs („closed-type cells“) sind hingegen im gesamten Gastrointestinaltrakt zu finden. Sie liegen eher lumenfern, sind klein und rund (Sakata, Nakamura et al. 2002).

Auch der Pankreas ist ein Ghrelin-produzierendes Organ. Immunhistochemische Untersuchungen mit einem Ghrelin-Antiserum zeigen eine Immunreaktivität in einer Fraktion von Inselzellen, die vor allem am Randbereich der Inseln zu finden sind. Die ghrelin-immunreaktiven Zellen stimmen dabei sehr häufig mit glucagon-reaktiven Zellen über ein (Date, Murakami et al. 2002; Dezaki, Hosoda et al. 2004; Kageyama, Funahasi et al. 2005). In verschiedenen Studien wurde Ghrelin-Immunreaktivität in α -Zellen (Date, Murakami et al. 2002; Wang, Xang et al. 2007) in β -Zellen (Granata, Settanni et al. 2007; Wang, Xang et al. 2007) und in neuen Inselzellen, unter anderem den ϵ -Zellen (Prado et al. 2004, Heller et al. 2005) gefunden.

4.1.4.2 Gehirn und Hypophyse

Da der Ghrelin-Rezeptor vor allem im Hypothalamus und der Hypophyse exprimiert wird, wurde angenommen, dass sein endogener Ligand ebenfalls hauptsächlich in diesen Regionen vorkommt (Howard, Feighner et al. 1996; Guan, Yu et al. 1997). Diese Hypothese wurde noch dadurch unterstützt, dass auch das andere GH-releasing Peptid, GHRH, im Hypothalamus produziert und in das hypophysäre System sezerniert wird um

dort zu wirken. Tatsächlich jedoch ist die Ghrelinkonzentration im ZNS sehr niedrig (Kojima, Hosoda et al. 1999; Hosoda, Kojima et al. 2000). Der größte Anteil kann im hypothalamischen Nucleus arcuatus gefunden werden, einer wichtigen Region für die Appetitkontrolle (Kojima, Hosoda et al. 1999; Lu, Guan et al. 2002). Zusätzlich hat eine neue Studie gezeigt, dass Ghrelin auch in anderen hypothalamischen Neuronen vorhanden ist, die mit dem dritten Ventrikel verbunden sind und zwischen den dorsalen, ventralen und paraventrikulären Kernen liegen (Cowley, Smith et al. 2003). Diese Neurone senden efferente Fasern zu nachgeschalteten Nervenzellen und bewirken dort eine Ausschüttung der orexigenen Peptide Neuropeptid Y (NPY) und agouti-related Protein (AgRP). Dieses Verteilungsmuster des Ghrelins ist ein weiteres Indiz für seine Rolle bei der Kontrolle der Nahrungsaufnahme.

Die Zielzellen des Ghrelins sind die somatotrophen GH-releasing Zellen der Hypophyse, die den GHS-R exprimieren (Bennett, Thomas et al. 1997; Guan, Yu et al. 1997; McKee, Palyha et al. 1997). Auch Ghrelin selbst kommt in der Hypophyse vor und kann so seine eigene Ausschüttung über parakrine oder autokrine Mechanismen beeinflussen (Korbonits, Bustin et al. 2001; Korbonits, Kojima et al. 2001).

4.1.4.3 Andere Gewebe

In der Niere wird die Ghrelin-mRNA vor allem in den Glomeruli exprimiert (Mori, Yoshimoto et al. 2000; Gnanapavan, Kola et al. 2002). Die Plasma-Ghrelin-Konzentration korreliert deutlich mit dem Serum-Kreatinin-Level und steigt bei Patienten mit einer terminalen Nierenerkrankung signifikant (Yoshimoto, Mori et al. 2002).

In den ersten zwei Trimenen können Ghrelin-produzierende Zellen in den Zytotrophoblasten der menschlichen Plazenta gefunden werden, im dritten Trimenon allerdings nicht mehr (Gualillo, Caminos et al. 2001).

Im Hoden wurde in den interstitiellen Leydig-Zellen und den Sertoli-Zellen eine Ghrelinproduktion nachgewiesen. Der Level der Ghrelinkonzentration in den Sertoli-Zellen ist allerdings sehr niedrig (Barreiro, Gaytan et al. 2002; Tena-Sempere, Barreiro et al. 2002).

4.2 Der Ghrelin-Rezeptor

4.2.1 Die Ghrelin-Rezeptor Familie

Der GHS-R besitzt mehrere Homologe, deren endogene Liganden gastrointestinale Peptide oder Neuropeptide sind. Figur 1 zeigt eine Dendogram-Aneinanderreihung, der Superfamilie des Ghrelin-Rezeptors. Zu dieser Superfamilie gehören Rezeptoren für Ghrelin, Motilin, Neuromedin U (Fujii, Hosoya et al. 2000; Hosoya, Moriya et al. 2000; Howard, Wang et al. 2000; Kojima, Haruno et al. 2000) und Neurotensin (Vincent, Mazella et al. 1999).

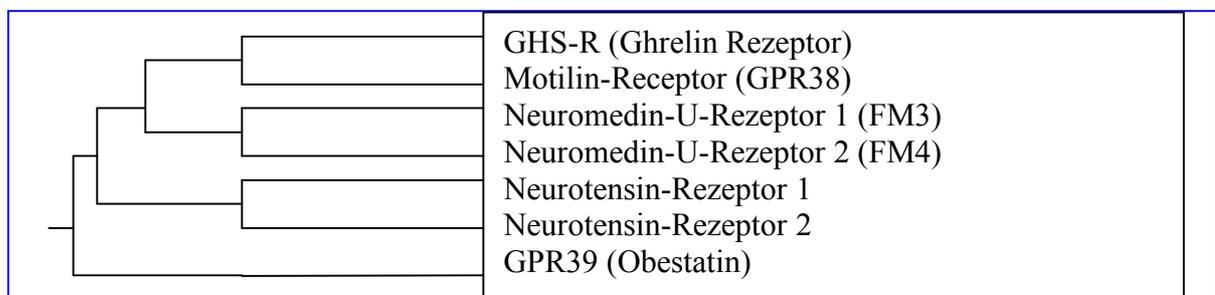


Tabelle 3: Dendogramm der Superfamilie des Ghrelinrezeptors (Kojima et al. 2005)

Der Ghrelin-Rezeptor, oder GHS-R, gehört zu der Familie der 7-TM-G-Proteingekoppelten Rezeptoren (7-TM-GPCR), besitzt also sieben transmembrane Domänen (Howard, Feighner et al. 1996; McKee, Palyha et al. 1997; Smith, Feighner et al. 1999) und kommt in vielen verschiedenen Geweben vor, wie z.B. Hypophyse, Hypothalamus, Magen, Herz, Lunge, Nieren, Darm, Fettgewebe, Blutgefäße, Immunzellen, etc. (Papotti, Ghe et al. 2000; Nagaya, Miyatake et al. 2001; Gnanapavan, Kola et al. 2002; Wang, Lee et al. 2002). Man vermutet, dass die unterschiedlichen Wirkungen des Ghrelins sowohl von den verschiedenen Rezeptorsubtypen, als auch von der jeweiligen Verteilung dieser Subtypen abhängen (Petersenn, Rasch et al. 2001; Gnanapavan, Kola et al. 2002).

Es wurden zwei verschiedene Ghrelin-Rezeptor-cDNAs isoliert (Howard, Feighner et al. 1996). Der GSH-R Typ 1a besteht aus 366 Aminosäuren und ist ein 7-TM-GPCR. Der GHS-R Typ 1b wird durch einen alternativen splicing-Mechanismus gewonnen und stellt

eine kürzere Isoform des GHS-R1a mit nur fünf der sieben TM-Domänen und einem zusätzlichen, 24 Aminosäuren langem, vom Intron codiertem Rest dar (Howard, Feighner et al. 1996). Dieser Typ1b ist eine am COOH-Ende verstümmelte Form des Typ 1a Rezeptors und pharmakologisch inaktiv. Während der physiologisch wichtigere GHS-R1a vor allem zentral zu finden ist, ist der GHS-R1b peripher in höherer Konzentration vorhanden. Seine physiologische Rolle ist noch nicht geklärt.

4.2.2 Die Aktivierung des Ghrelin-Rezeptors und Signalweiterleitung

Ghrelin wirkt bei Bindung an seinem Rezeptor, dem GSH-R, durch eine Aktivierung der Phospholipase C, was über die Bildung von Inositoltriphosphat und Diacylglycerol und der Aktivierung der Proteinkinase-C, zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums führt. Ausserdem werden die Kaliumkanäle gehemmt und so der Kalziueinstrom über spannungsabhängige L- und T- Kanäle ermöglicht (Chen, Wu et al. 1996; Frohman, Kineman et al. 2000).

4.2.3 Die Verteilung des Ghrelin-Rezeptors

Die Ghrelin-Rezeptor-mRNA wird vor allem im ZNS und hier hauptsächlich im Nucleus arcuatus, im ventromedialen Nucleus und im Hippocampus exprimiert (Howard, Feighner et al. 1996; Guan, Yu et al. 1997; Nakazato, Murakami et al. 2001). Der Ghrelin-Rezeptor ist sehr sensitiv für GH. Seine Expression ist bei GH-negativen dw/dw-Zwergratten erhöht. Eine Behandlung dieser Ratten mit GH führt zu einer Senkung der Expression des Ghrelin-Rezeptores (Bennett, Thomas et al.1997).

Auch in verschiedenen anderen cerebralen Regionen (den hypothalamischen Kernen, der Hypophyse, dem Gyrus dentatus, den CA2 und CA3 Regionen des Hippocampus, der Substantia nigra, der ventralen Region des Tegmentums und den dorsalen und medialen Nucleus raphe) kann der Rezeptor gefunden werden (Bennett, Thomas et al.1997).

Neben dem ZNS wurden durch RT-PCR Untersuchungen auch in vielen peripheren Organen eine GHS-R-mRNA-Expression nachgewiesen. Zu diesen Organen gehören Herz, Lunge Leber, Niere, Pankreas, Magen, Dünn- und Dickdarm, Fettgewebe, und

Zellen des Immunsystems (Guan, Yu et al. 1997; Hattori, Saito et al. 2001; Kojima, Hosoda et al. 2001; Gnanapavan, Kola et al. 2002), was nahe legt, dass Ghrelin vielfältige Aufgaben in diesen Geweben erfüllt (Broglia, Gottero et al. 2003).

4.3. Die physiologischen Funktionen des Ghrelins

4.3.1 GH-Releasing Aktivität

Seit 25 Jahren ist bekannt, dass mit den in vitro hergestellten Wachstumshormon-Sekretagoga (Growth hormone secretagogues) ein von GHRH unabhängiger Weg der Steuerung der GH-Ausschüttung existiert, der über Ghrelin läuft. Wie schon von mehreren Autoren gezeigt, führt Ghrelin bei Ratten in vivo und in vitro zu einer Wachstumshormonfreisetzung (Argetsinger and Carter-Su 1996; Chan, Bullen et al. 2004; Chang, Ren et al. 2004; Chang, Zhao et al. 2004). Beim Menschen ist die endokrine Wirkung des Ghrelins stark von der Dosis abhängig (Arvat, Di Vito et al. 2000; Date, Murakami et al. 2000; Peino, Baldelli et al. 2000; Takaya, Ariyasu et al. 2000; Arvat, Maccario et al. 2001). Die stimulierende Wirkung auf die GH-Sekretion ist schon in niedrigen Dosierungen (0,2 µg/kg KG) ausgeprägt (Peino, Baldelli et al. 2000; Takaya, Ariyasu et al. 2000; Arvat, Maccario et al. 2001). Bei Versuchen an Ratten (Kojima, Hosoda et al. 1999; Date, Kojima et al. 2000) und freiwilligen Testpersonen zeigte sich, dass Ghrelin wenn es intravenös in höheren Dosierungen gegeben wird, außerdem zu einem Anstieg der ACTH-, Kortisol-, Epinephrin- und Prolaktinspiegel führt. Keine Wirkung zeigt das Hormon allerdings auf die Ausschüttung von LH, FSH und TSH (Peino, Baldelli et al. 2000; Takaya, Ariyasu et al. 2000).

Zusammenfassend wurde bewiesen, dass Ghrelin beim Menschen der wirkungsvollste Stimulator für die GH-Ausschüttung ist (Hataya, Akamizu et al. 2001; Pombo, Pombo et al. 2001).

4.3.2 Die Appetitregulation

4.3.2.1 Allgemeine Mechanismen der Körpergewichtsregulation

In den letzten Jahren wurden immer weitere Details über den Regelkreis der Energiebilanz und des Körpergewichts bekannt. Nach der heutigen Auffassung wird die Kalorienaufnahme, die Wahl der verschiedenen Nahrungsmittel, die Verwendung und Speicherung der gewonnenen Energie vor allem durch einen neuroendokrinen Regelkreis gesteuert, der in erster Linie im Hypothalamus und der Medulla oblongata lokalisiert ist. In diesem Modell herrscht ein konstanter Informationsfluss aus dem gastrointestinalen System und dem Fettgewebe zu spezifischen gut-related Protein/Neuropeptid Y- (AGRP/NPY) und Pro-opiomelanocortin- (POMC) Neuronenpopulationen im Nucleus arcuatus des Hypothalamus, um den Energiestatus und -bedarf festzustellen. Umgekehrt antworten Neuropeptide und Neurotransmitter des ZNS über die Neuronen des autonomen Nervensystems und des endokrinen Nervensystems an ihre Zielorgane. Die Energiehomöostase wird so dynamisch über ein stetiges Vergleichen der verschiedenen Energiebilanzen und metabolischen Komponenten gewährleistet.

Die Nahrungsaufnahme führt zu einem Dehnungsreiz im Magen, der über vagale Afferenzen und zentral über den Ncl. arcuatus und den Hypothalamus vermittelt wird. Hier werden orexigene und anorektische Neuropeptide sezerniert. Die orexigenen Neuropeptide führen zur Nahrungsaufnahme, während die anorektischen Neuropeptide Sättigung induzieren. (Arora, 2010; Berthoud, 2006)

Im Ncl. arcuatus werden im Wesentlichen NPY und AgRP im Bereich des ventromedialen Kerngebietes sezerniert und POMC im Bereich des dorsolateralen Kerngebietes. NPY und AgRP sind sich in ihrer anabolen Wirkung sehr ähnlich, besitzen jedoch unterschiedliche Rezeptoren und Kinetik (Cummings and Schwartz 2003). Während beispielsweise eine intracerebroventrikuläre Injektion von NPY die Nahrungsaufnahme für kurze Zeit stark erhöht, führt eine Injektion von AgRP zu einem Anstieg, der zwar geringer ist, aber länger anhält (Hagan, Rushing et al. 2000).

Die zweite Ebene der Appetitkontrolle ist der Hypothalamus. Wie bereits erwähnt unterscheidet man hier zwei Areale mit gegenläufiger Wirkung. Auf der einen Seite steht

das sogenannte „Hungerzentrum“. Es befindet sich im lateralen Anteil des Hypothalamus und im benachbarten, perifornikalen Bereich. Wird diese Gehirnregion stimuliert, kommt es zu einer vermehrten Nahrungsaufnahme, also Hyperphagie und in der Folge zu Adipositas. Bei einer Schädigung hingegen steht die Gewichtsabnahme im Vordergrund (Bray 1990). Die Neuronen erster Ordnung treffen hier auf Nervenzellen, die anabole Neuropeptide exprimieren, wie beispielsweise Melanin-Concentrating-Hormone (MCH), Orexin A und Orexin B (Elmquist 2001). Von hier werden Signale an verschiedene Regionen des Kortex geschickt, die zum Auftreten eines Hungergefühls beitragen.

Den antagonistischen Part hierzu bildet das „Sättigungszentrum“, das in der Region des Nucleus paraventricularis hypothalami (PVN) lokalisiert zu sein scheint (Schwartz, Woods et al. 2000; Elmquist 2001). Die von hier ausgehenden NPY/AgRP- und POMC-Neurone senden ebenfalls Efferenzen zum Kortex und führen zu einer Freisetzung von TRH und CRH aus den Axonen in der Hypophyse. Diese beiden hypothalamischen Releasinghormone steigern den Energieverbrauch bei gleichzeitiger Verminderung der Nahrungsaufnahme durch Stimulation der Schilddrüse, bzw. durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems (Bray 1990).

In immunhistologischen Untersuchungen zeigte sich, dass Ghrelin-enthaltende Neurone vor allem im Nucleus arcuatus (ARC) des Hypothalamus, einer Region, die eine wichtige Rolle in der Appetitregulation spielt, gefunden werden können (Kojima, Hosoda et al. 1999; Lu, Guan et al. 2002). Man ging deswegen davon aus, dass Ghrelin Einfluss auf die Nahrungsaufnahme hat.

In der Region des ARC senden die Ghrelin-enthaltenden Neurone efferente Fasern zu NPY- und AgRP-exprimierenden Neuronen um die Ausschüttung dieser orexigenen Peptide zu stimulieren und auch zu POMC-Neuronen um die Ausschüttung dieses anorektischen Peptides zu inhibieren.

Das neuronale Netzwerk zwischen Ghrelin und dem Nucleus paraventricularis des Hypothalamus (PVN) ist komplexer. In der Region der PVN senden die Ghrelinneurone efferente Fasern auch zu den NPY-Neuronen, die die GABA-Ausschüttung supprimieren und führen so über eine Stimulation der corticotropin-releasing-Hormon(CRH)- Neurone zu einer erhöhten Ausschüttung von ACTH und Kortisol.

Zu den peripheren Steuerungsmechanismen der Nahrungsaufnahme gehören vielfältige mechanische, neuronale und humorale Signale, vor aus dem Gastrointestinaltrakt. Das Sättigungsgefühl wird vermittelt durch verschiedene Faktoren, wie Magendehnung und

enterische Neuropeptide, z.B. Cholezystokinin, Glukagon, Glucagon-like-peptide 1, Amylin, Bombesin-related peptides, Apolipoprotein A-IV, Enterostatin (Woods, Seeley et al. 1998; Smith 1999) und auch Leptin. Als Hauptangriffspunkt dieser Signale vermutet man das Stammhirn, genauer den Nucleus tractus solarii (Cummings and Schwartz 2003).

Diese peripheren, humoralen Faktoren, die an der Regulation des Appetits beteiligt sind, sind noch nicht lange bekannt und nicht bis ins letzte Detail verstanden (Neary, Goldstone et al. 2004; Small and Bloom 2004; Wynne, Stanley et al. 2004).

Neuere Forschungen beschäftigen sich auch mit der Rolle des Geschmacks und der Nahrungszusammensetzung bei der Appetitentwicklung. Die Geschmackssensoren im Mund bilden die „Torhüter“ des Gastrointestinaltraktes. Sie detektieren die 4 bekannten Geschmacksrichtungen: süß für gutes Essen, bitter und sauer für gefährliche oder sogar giftige Nahrung und salzig. Man geht davon aus, dass es wahrscheinlich auch einen Geschmack für Fett gibt. Das olisensorische System ist in der Lage die Zusammensetzung und auch die Menge an Nährstoffen in der Nahrung zu detektieren. Es spielt somit eine große Rolle beim Essverhalten und der Regulation der Energiebilanz. Vor allem trägt es dazu bei, dass bestimmte Nahrungsstoffe eine Art Belohnungsgefühl hervorrufen und zu einem Fortsetzen der Nahrungsaufnahme führen (Berhoud, 2008).

4.3.2.2 Ghrelin und die Regulation der Nahrungsaufnahme

4.3.2.2.1 Ghrelin als Hungersignal

Ghrelin stellte 1999 den ersten identifizierten Hungerbotenstoff aus dem peripheren Gewebe dar. Es hat seinen Peak vor der Nahrungsaufnahme. Es geht den Geschmacksinformationen vorweg und übt appetitstimulierende Wirkung aus. Nebenbei wirkt es auf Komponenten des Belohnungszentrums im Gehirn und erhöht so den Drang zur Nahrungsaufnahme. Verschiedene Studien weisen auf seine Schlüsselrolle bei der Kurz- und Langzeitregulation von Nahrungsaufnahme und Energiehaushalt hin (Castanede, Tong et al. 2009).

Aktuelle Studien mit MRT-Untersuchungen zeigen, dass die Gabe von Ghrelin die neuronale Antwort auf Bilder von Nahrung in der Amygdala, dem orbitofrontalem Cortex,

der vorderen Insel und dem Striatum erhöht (Malik, McGlone et al. 2008). Ghrelin scheint auf den hedonistischen Effekt des Essens zu wirken und bei der individuellen Nahrungszusammensetzung, unabhängig vom Ernährungszustand, eine Rolle zu spielen (Drazen, Vahl et al. 2006).

Ghrelin erwies sich von allen bislang entdeckten orexigenen Peptiden, als das stärkste. Eine intracerebroventrikuläre Injektion führt zu einer deutlich gesteigerten Nahrungsaufnahme was bei regelmäßiger Applikation zusammen mit einem verminderten Energieverbrauch zu Gewichtszunahme und erhöhter Fettmasse führt (Tschop, Smiley et al. 2000; Asakawa, Inui et al. 2001; Kamegai, Tamura et al. 2001; Nakazato, Murakami et al. 2001; Shintani, Ogawa et al. 2001; Wren, Seal et al. 2001). Nicht nur die intracerebroventrikuläre Injektion, auch die intravenöse und subkutane Injektion von Ghrelin bewirken eine Erhöhung der Nahrungsaufnahme (Tschop, Smiley et al. 2000; Nakazato, Murakami et al. 2001; Wren, Seal et al. 2001). Diese Wirkung des Ghrelins scheint unabhängig von seinem stimulierenden Effekt auf die Freisetzung des Wachstumshormons (GH) zu sein. Eine vermehrte Ausschüttung von GH führt im Körper zu verstärktem Knochenwachstum und Muskelaufbau (Lissett and Shalet 2000; Wells and Houston 2001). Ghrelin hingegen bewirkt eine Zunahme des Fettgewebes, die Knochen- und Muskelmasse bleibt unverändert (Tschop, Smiley et al. 2000). Versuche an GH-negativen Ratten, bei denen nach Ghrelin-Gabe dieselben metabolischen Veränderungen auftraten, wie bei normalen Ratten bestätigen diese Annahme (Tschop, et al. 2000). Ghrelin wird primär in gastrointestinalen Organen als Reaktion auf Nahrungsmangel und Hunger gebildet und zirkuliert im Blut als peripheres Signal, das dem ZNS befiehlt, die Nahrungsaufnahme zu steigern.

4.3.2.2 Mechanismus der Appetitstimulation durch Ghrelin

Wesentliche Erkenntnisse über den Mechanismus der Appetitstimulation durch Ghrelin wurden 2000 durch pharmakologische Studien erlangt, die u.a. zeigten, dass eine zweiwöchige subkutane Gabe von Ghrelin zu einer Gewichtszunahme bei gesunden und GH-defizienten Ratten führte (Wren, Small et al. 2000; 2001). Ghrelin zeigt seine Wirkung folglich auch, wenn es peripher injiziert wird, während alle anderen bekannten orexigenen Neuropeptide (NPY; AGRP; MCH) nur wirken, wenn sie intracerebral verabreicht werden.

Das peripher injizierte Ghrelin zeigt eine deutlich reduzierte c-fos-Expression im Vergleich zu einer icv-Injektion.

Dass Ghrelin-Rezeptoren an den NPY/AGRP-Neuronen im ARC exprimiert werden (Mori, Yoshimoto et al. 2005) wurde durch immunhistochemische Versuche und in situ-Hybridisierung gezeigt.

Der hypothalamische ARC ist die zentrale Region der Ghrelinaktivität im ZNS.

Ghrelin kann den ARC leicht über den Blutweg erreichen, da er ausserhalb der Blut-Hirn-Schranke liegt.

Zusammenfassend wirkt Ghrelin auf die Appetitstimulation im Wesentlichen über 3 Pfade. Einerseits erreicht das zirkulierende Ghrelin die Zellkörper der orexigenen NPY/AGRP-Neuronen oder deren terminale Enden im ARC und aktiviert sie, wodurch im Umkehrschluss die anorexigenen POMC-Zellen im ARC gehemmt werden. Ein zweiter Weg wird im nächsten Kapitel besprochen, er führt über den Nervus vagus, über den zirkulierendes oder im Magen produziertes Ghrelin über den Nucleus tractus solitarius letztlich an den hypothalamischen, appetitstimulierenden Nuclei wirkt. Der dritte Wirkungsmechanismus besteht aus dem, im Hypothalamus lokal produzierten Ghrelin, das orexigene NPY/AGRP Neuronen im ARC und orexigene Neurone im lateralen Hypothalamus aktiviert.

Ghrelin erhöht so die Häufigkeit der Nahrungsaufnahme ohne die Größe der Mahlzeit zu beeinflussen. Es erhöht die gastrale Motilität und senkt die Insulinsekretion (Cummings, Overduin et al. 2007, Cummings, Purnell et al. 2001, Tschop, Smiley et al. 2000). Neue Erkenntnisse scheinen zu bestätigen, dass Ghrelin ausserdem als eine Art „Vorbereiter“ zur Nahrungsaufnahme gilt. So führt es, wenn es zentral gegeben wird zur Induzierung der Lipogenese im weissen Fettgewebe, in dem es das hypothalamische Melanocortin-System hemmt (Santiago-Alvarellos, Vazquez et al. 2009; Nogueiras, Wiedmer et al. 2007).

4.3.2.2.3 Der Vagus und die Appetitstimulation durch Ghrelin

Im Allgemeinen können peripher injizierte Peptide die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren. Die Entdeckung von Ghrelin-Rezeptoren auf vagalen afferenten Neuronen in den Ganglienknotten der Ratte legt nahe, dass die Signale des Ghrelins vom Magen über den

Vagus zum Gehirn weitergeleitet werden (Date, Murakami et al. 2002; Sakata, Yamazaki et al. 2003; Zhang, Lin et al. 2004). Die intracerebroventrikuläre Injektion von Ghrelin induziert eine erhöhte c-Fos-Expression in den dorsomotorischen Kernen des Vagus und stimuliert die Sekretion der Magensäure, was darauf hindeutet, dass Ghrelin auch efferent über das Vagussystem wirkt (Date, Nakazato et al. 2001).

Tatsächlich kann durch eine Vagotomie, die Fähigkeit des Ghrelins zur Steigerung der Nahrungsaufnahme und der GH-Ausschüttung, ausgeschaltet werden (Date, Murakami et al. 2002). Der basale Level des Ghrelins wird hierbei nicht beeinflusst, die normalerweise durch Fasten induzierte Steigerung des Plasmaspiegels von Ghrelin hingegen wird total unterdrückt (Williams, Grill et al. 2003).

Eine sensorische Denervation der afferenten Fasern des N. vagus durch Applikation von Capsaicin, einem spezifischen afferenten Neurotoxin, zeigte ähnlich Effekte (Date, Murakami et al. 2002).

4.3.2.2.4 Zusammenhang zwischen Ghrelin und Appetit

Der Plasmalevel des Ghrelin steigt unmittelbar vor jeder Mahlzeit an und fällt innerhalb einer Stunde wieder auf minimale Konzentrationen ab (Cummings, Purnell et al. 2001; Tschop, Wawarta et al. 2001). Der klare Anstieg vor dem Essen unterstützt die Hypothese, dass Ghrelin ein Initiationssignal bei der Nahrungsaufnahme ist. Diese Untersuchung wurde bei Menschen durchgeführt, die freiwillig, je nach Hungergefühl zu essen anfangen sollten (Cummings, Frayo et al. 2004). Dabei zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem Ghrelin-Level und dem Hunger-Score. Der postprandiale Abfall der Ghrelin-Konzentration erwies sich als proportional zur aufgenommenen Kalorienmenge (Cummings, Frayo et al. 2004). Zusammenfassend wurde die Hypothese, dass Ghrelin als Hungersignal fungiert, weiter bestätigt.

Toshinai et al. untersuchten die Veränderung der Plasmakonzentration des Ghrelins genauer. Sie fanden heraus, dass es bereits 48-h nach Fastenbeginn zu einer erhöhten Expression von Ghrelin-mRNA im Magen und einer Steigerung der Plasmakonzentration kommt, die tatsächliche Menge des Peptides in den Magen zellen hingegen nimmt ab. Das zeigt, dass beim Fasten vor allem die Sekretion gesteigert wird (Toshinai et al. 2001).

Auch die Expression des Ghrelin-Gens ist vom Appetit abhängig. Sie wird beim Fasten erhöht und sinkt nach Gabe von Leptin und Interleukin (IL)-1 β (Toshinai, Mondal et al. 2001; Kim, Yoon et al. 2003).

Durch all diese Eigenschaften kristallisiert sich auch eine eventuelle klinische Anwendungsmöglichkeit des Ghrelins bei pathologischem Gewichtsverlust, wie er als Begleiterscheinung bei einigen Arzneimittel und Operationen oder auch bei Krankheitszuständen, wie Malignomen oder AIDS auftritt. Bei solchen Patienten könnte Ghrelin helfen, da es eine positive Energiebilanz begünstigt, in dem es die Nahrungsaufnahme erhöht und den Energieverbrauch senkt und zudem die IL-1- β -induzierte Anorexie blockiert.

4.3.3 Gastrointestinale Funktionen

Zusätzlich zu seiner zentralen, appetitstimulierenden Wirkung führt Ghrelin peripher im Gastrointestinaltrakt vor allem zu einer Zunahme der Magensäuresekretion (Date, Kojima et al. 2000; Masuda, Tanaka et al. 2000; Date, Nakazato et al. 2001) und einer gesteigerten Motilität des Magens und des Duodenums (Masuda, Tanaka et al. 2000).

Wird Ghrelin intravenös oder intraperitoneal gegeben, so stimuliert es den „migrating motor complex“ im nüchternen Zustand und erhöht, im postprandialen Stadium, die Magenentleerung bei Tieren und Menschen (Edholm, Levin et al. 2004; Levin, Edholm et al. 2006).

Fujino et al. untersuchten am Rattenmodell, inwieweit Ghrelin in die Regulation der Motilität des Gastrointestinaltrakts eingreift und welche Rolle die Applikationsweise dabei spielt. Bei den Versuchen zeigte sich, dass ein intravenös applizierter GHS-R-Antagonist, bei vagotomierten Ratten den Magen und das Duodenum blockiert, bei normalen Ratten nicht. Da bekannt ist, dass der GHS-R sowohl peripher, als auch cerebral existiert (Guan, Yu et al. 1997; Shuto, Shibasaki et al. 2001), das endogene Ghrelin hingegen vor allem im Magen zu finden ist und im Gehirn nur in geringen Mengen, erscheint es plausibel, dass das endogen produzierte Ghrelin des Magens die gastroduodenale Motilität sowohl über die Rezeptoren im Magen als auch über die des Gehirns reguliert (Fujino, Inui et al. 2003).

Eine Antagonisierung der Ghrelinwirkung gelang bei i.v.- und i.c.v.- Gabe nur, wenn GHS-R-Antagonisten auf die gleiche Weise appliziert wurden, oder eine Immun-Neutralisation von NPY im Gehirn vorgenommen wurde. Die i.v.- Effekte des Ghrelins konnten allerdings bei i.c.v.- Gabe der Antagonisten nicht inhibiert werden.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse der Forschungsgruppe, dass Ghrelin über eine Aktivierung der NPY-Neurone im Gehirn und eine Weiterleitung der Signale über den Vagus wirkt. Sobald dieser Aktivierungsweg ausgeschaltet wird, z.B. durch Vagotomie, wirkt Ghrelin in erster Linie über Ghrelin-Rezeptoren direkt im Magen und im Duodenum, diese Wirkung des Ghrelins ist dann stark pH-abhängig und lässt mit sinkendem pH nach, bzw. verschwindet vollständig (Fujino, Inui et al. 2003).

In Versuchen mit Ghrelin-Analoga wie RC-1139 oder synthetischen Ghrelin-Rezeptor-Agonisten (TZP-101) wurde erst vor kurzem die eventuelle Einsetzbarkeit des Ghrelins bei Störungen der gastrointestinalen Motilität, beispielsweise bei postoperativem Ileus oder diabetischer Gastroparese untersucht. Vor allem bei postoperativen Ileus zeigte sich hier erfolgsversprechende Ergebnisse mit einer deutlichen Zunahme der Motilität (Poitras, Polvino et al. 2005; Venkova, Fraser et al. 2007).

Ghrelin hat zudem gastroprotektive Funktionen, wie in einer Studie bewiesen wurde, in der eine ischämische Schädigung der Mukosa bei Ratten induziert wurde. Es führt über Aktivierung sensorischer Nerven, stickstoffinduzierter Hyperämie, Erhöhung der Angiogenese durch YEGF-Expression und antiinflammatorischen Eigenschaften zu einer deutlich schnelleren Heilung der Defekte. (Konturek, Brzozowski et al. 2006).

4.3.4 Kardiovaskuläre Funktionen

GHS-R wurde auch im kardiovaskulären Gewebe des Menschen, vor allem im Myokard und in der Aorta (Nagaya, Kojima et al. 2001) nachgewiesen. Es zeigte sich, dass Ghrelin neben den X/A-like Zellen des Magens auch noch von den Zellen der Kardiozytenzelllinie HL-1 und von kultivierten menschlichen Vorhof-Kardiomyozyten gebildet wird (Iglesias, Pineiro et al. 2004). Ghrelin hat auf das kardiovaskuläre System einen positiven Einfluss. So kommt es zu einer Verbesserung der Hämodynamik (Nagaya, Kojima et al. 2001; Enomoto, Nagaya et al. 2003; Poykko, Kellokoski et al. 2003) und einer kardioprotektiven Wirkung nach Ischämie (Chang, Ren et al. 2004). Bei Ratten führt es zu einer Steigerung

der Kontraktilität und zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion (Chang, Ren et al. 2004). Beim Menschen berichteten Nagaya et. al als erste von einer signifikanten Erhöhung des Outputs bei chronischen Herzerkrankungen (Nagaya, Miyatake et al. 2001). Ghrelin stellt einen effektiven Vasodilatator dar (Iglesias, Pineiro et al. 2004). Es führt zu einer Senkung des Blutdrucks und einer Erhöhung des Schlagvolumens, ohne die Herzfrequenz zu beeinflussen. Bei Ghrelingabe kann eine signifikante Abnahme der Marker für das Ausmass der Herzschädigung, wie LDH (Lactat-Dehydrogenase) und MDA (Malondialdehyd) verzeichnet werden (Chang, Zhao et al. 2004). Auch die Konzentration der Endothelin-1 mRNA, das eine Schlüsselsubstanz bei kardiovaskulären Erkrankungen und einer der wirkungstärksten Vasokonstriktoren ist, war niedriger, wenn Ghrelin appliziert wurde. (Chang, Ren et al. 2004)

Wie genau Ghrelin diese kardioprotektiven Effekte ausübt, die auch zu einer signifikanten Verkleinerung der Infarktfläche führen (Chang, Ren et al. 2004), ist noch nicht vollständig geklärt.

4.3.5 Ghrelin und die Pankreasfunktion

Wie schon erwähnt, sind Ghrelin und GHS-Rezeptoren auch im Pankreas lokalisiert. (Date, Nakazato et al. 2002). Ghrelin ist ein wichtiger Bestandteil der Glukose-Insulin-Homöostase. Ghrelin wirkt inhibierend auf die Insulinausschüttung beim Menschen, sowie bei Ratten und Mäusen (Broglio, Arvat et al., 2001, Egido, Rodriguez-G et al. 2002, Dezaki, Hosoda et al 2004). Niedrige Plasmaghrelinspiegel sind mit erhöhtem Fastenspiegel des Insulins und einer Insulinresistenz verbunden (Ikezaki, Hosoda et al. 2002, Poykko, Kellokoski et al, 2003).

Exogenes Ghrelin erhöht den Blutglukosespiegel in Menschen und Nagern direkt über eine spezifische Interaktion mit dem GHS-R. (Broglio, Benzo et al 2003, Dezaki, Hosoda et al 2004). Dieser hyperglykämische Effekt des Ghrelins geschieht über eine Senkung des Plasmainsulinspiegels.

Dass auch das endogene Ghrelin in die Regulation der Plasmainsulin- und Glucoselevel eingebunden ist, zeigen verschiedene Studien, bei denen spezifische GHS-R-Antagonisten intraperitoneal gegeben, bei fastenden Mäusen zu einer verminderten Blutglukosekonzentration führten (Dezaki, Hosoda 2004). Zudem zeigten Esler et al.,

dass die Glucosetoleranz bei Ratten durch die orale Gabe eines GHS-R Antagonisten verbessert wurde (Esler, Rudolph et al.). Dies geschah ohne eine Hypoglykämie zu induzieren durch eine Stimulation der Insulinsekretion.

Die Downregulation des Insulinlevels scheint über das lokal in den Inselzellen produzierte Ghrelin, also para/autokrin zu geschehen, wie Dezaki et al. in Versuchen mit gastrektomierten Ratten zeigten. (Dezaki, Hosoda et al 2004)

Interessanterweise scheint das G-Protein, das für die Wirkung des Ghrelins auf die Insulinausschüttung verantwortlich ist ein anderes zu sein, als das, das beispielsweise für die GH-Ausschüttung zuständig ist (Dezaki, Kakei et al. 2007).

Daten aus Studien mit GHS-R-Antagonisten zeigen mögliche therapeutische Ansätze für Ghrelin bei der Therapie des Typ II Diabetes. Ghrelin steuert den physiologischen Level der Insulinausschüttung. Unter Bedingungen, bei denen das systemische Bedürfnis nach Insulin die physiologische Produktion überschreitet, wie z.B. in frühen Stadien ernährungsbedingter Fettleibigkeit, oder Insulinresistenz. Hier könnte eine Blockade der Ghrelinfunktion über einen GHS-R-Antagonisten die Insulinsekretion und so auch die Glucoseintoleranz erhöhen. Dies könnte ein Ansatz sein, der Progression des Typ 2 Diabetes entgegen zu wirken (Dezaki, Sone et al. 2008).

Neben den oben beschriebenen Wirkungen des Ghrelins auf den endokrinen Pankreas, wirkt es auch auf den exokrinen Pankreas inhibierend (Zhang, Chen et al. 2001; Konturek, Pepera et al. 2003)

4.3.6 Leben ohne Ghrelin

4.3.6.1 Ghrelin knock-out Mäuse

Ghrelin Knock-out Mäuse zeigen eine normale Größe, normales Wachstum, Futteraufnahme, Körperaufbau, Reproduktion, ohne pathologische Veränderungen, aber auch eine signifikante Reduktion des Respirations-Quotienten und, bei hochkalorischer Diät, eine Tendenz zu einem niedrigeren Bodymass-Index (Wortley, Anderson et al. 2004). Die Funktion des Ghrelins wird offensichtlich durch andere orexigene Substanzen übernommen, wenn es nicht vorhanden ist.

4.3.6.2 GHS-R knock-out Mäuse

Bei Mäusen, denen der GHS-R fehlt, fehlt der übliche Anstieg der GH-Ausschüttung und der Nahrungsaufnahme nach Ghrelin-Gabe. Folglich ist der GHS-R in der Tat der primäre biologisch relevante Ghrelin-Rezeptor (Sun, Wang et al. 2004). Wachstum, Entwicklung und Körperbau der GHS-R-negativen Mäuse sind normal. Ghrelin und sein Rezeptor sind also nicht allein entscheidend für das Wachstum und die Appetitregulation.

Das Gewicht der GHSR-negativen Mäuse ist jedoch im Vergleich zum Wildtyp etwas gesenkt.

4.3.6.3 Die totale Gastrektomie

Der Magen ist die Hauptquelle des zirkulierenden Ghrelins (Ariyasu, Takaya et al. 2001). Nach einer Gastrektomie kommt es zu einer Senkung der Plasmakonzentration des Ghrelins auf ca. ~30-50% (Messung 30 Minuten nach Operation). Im postoperativen Verlauf kommt es zu einem Wiederanstieg des Ghrelins auf bis zu 70% des Ausgangswertes. (Lehto-Axtelius, Chen et al. 2002; Hosoda, Kojima et al. 2003; Leonetti, Silecchia et al. 2003) Aufgrund dieser Messungen geht man davon aus, dass der Magen für die Produktion von ca. ~50-70% des zirkulierenden Hormons verantwortlich ist. Bei Ausfall kann sie nur unzureichend durch eine kompensatorische Produktion des Intestinums und des Pankreas ausgeglichen werden.

4.3.6.4 Gastric- Bypass-Operation

Die Gastric-Bypass-Operation zeigt im Vergleich zu diätischen Massnahmen und anderen Eingriffen, wie das Anlegen eines Magenbandes, die besten Langzeitergebnisse hinsichtlich der Gewichtsreduktion, der metabolischen Gesamtsituation und der Überlebensrate. In verschiedenen Studien wurde eine signifikante, langzeitige Gewichtsreduktion verbunden mit einer deutlichen Senkung des Ghrelinspiegels

beobachtet. So berichteten beispielsweise Frühbeck et al. von einer Reduktion von bis zu 60% nach 6 Monaten (Frühbeck, Diez-Caballero et al. 2004).

Dieses Phänomen wird zum einen dadurch erklärt, dass es durch die Operation zu einer Verletzung des N.Vagus kommt und damit zu einer Störung des vagalen Inputs auf die ghrelinproduzierenden Zellen (Williams, Grill, et al. 2003). Zum anderen wird durch die Operation das Magenvolumen vermindert und die Nahrung an den größten Teilen des Magens und des oberen Intestinums vorbeigeleitet (Cummings, Overduin et al. 2004).

4.4 Die Regulation der Ghrelin-Sekretion

4.4.1 Allgemeine Regulationsmechanismen

Die Regulation der Ghrelinsekretion kann auf vielen Ebenen geschehen. Über die Transkription und Translation des Genes, über postrtranslationelle Modifikationen, über die Sekretion aus den jeweiligen Ghrelin-produzierenden Zellen, über die Bindung an Transportproteine, Überqueren der Blut-Hirn-Schranke, über die Bindung an den Ghrelin-Rezeptor und über Modifikation der Expression und der intrazellulären Signalweiterleitung dieses Rezeptores bis zur Ausscheidung über Leber und Nieren.

Die genauen Mechanismen der Regulation der Ghrelinsekretion sind bis lang nicht vollständig geklärt. Ziel dieser Arbeit war es, auf diesem Gebiet weitere Kenntnisse zu erlangen.

Primär muss unterschieden werden zwischen dem Basalspiegel und den kurzfristigen Veränderungen vor, während und nach Nahrungsaufnahme.

Der Basalspiegel ist abhängig vom Ernährungszustand. Er ist erhöht in Situationen mit verringerter Nahrungsaufnahme, wie Fasten oder Kachexie. Bei gesteigerter bei Adipositas ist er erniedrigt. Es besteht somit eine negative Korrelation mit dem Body-Mass-Index. (Tschop, Weyer et al. 2001), (Ariyasu, Takaya et al. 2001).

Für kurzfristige Veränderungen der Ghrelin-Sekretion ist die Nahrungsaufnahme der wichtigste Faktor. Die Ghrelin-Konzentration steigt bei Menschen und Nagern vor Nahrungsaufnahme stark an, um danach rasch wieder ab zu sinken (Cummings, Purnell et al. 2001). Wie die postprandiale Ghrelin-Suppression reguliert wird ist noch nicht restlos verstanden. Die Hypothese, dass die Magendehnung hierfür verantwortlich ist

wurde widerlegt. Die alleinige Dehnung des Magens zeigte in Versuchen keine Wirkung auf die Ghrelin-Sekretion (Shiia, Nakazato et al. 2002, Erdmann, Lippl et al. 2003). Die Zusammensetzung der Nahrung hingegen scheint eine große Rolle zu spielen; ebenso die verschiedenen anderen gastrointestinalen Hormone und der N. Vagus, wie bereits beschrieben.

Es wurde auch ein Tages-Nacht-Rhythmus der Ghrelinssekretion beobachtet, mit normalerweise höheren Leveln nachts, die zwischen 2- und 4 Uhr wieder absinken (Chan, Bullen et al. 2004).

4.4.2 Nahrungszusammensetzung und Ghrelinsekretion

Erdmann et al. zeigten in verschiedenen Versuchen mit freiwilligen Testpersonen, dass auch die Nahrungszusammensetzung die Ghrelinsekretion beeinflusst. Anders als bei den meisten anderen gastrointestinalen Hormonen führte eine kohlenhydratreiche Nahrung zu einem Absinken des Ghrelinspiegels. Auch fettreiche Nahrung führt zu einer verminderten Sekretion. Beim Menschen kommt es nach einer proteinreichen Nahrung zum Anstieg der Ghrelinsekretion bei Ratten hingegen zu einem Abfall (Erdmann, Lippl et al. 2003; Lee, Wang et al. 2002).

4.4.3 Nervus vagus und Ghrelinsekretion

Eine besondere Rolle bei der Nahrungsaufnahme spielt der Nervus vagus. Über seine afferenten und efferenten Fasern wird die parasympathische Steuerung des gastrointestinalen Trakts vermittelt. Er beeinflusst die Ghrelinsekretion wahrscheinlich direkt durch die enge Nachbarschaft seiner cholinergen Nervenendigungen zu den Ghrelin-produzierenden Zellen des Magens (Nilsson, Simon et al. 1972), aber auch indirekt über die von ihm gesteuerte Sekretion anderer Hormone (Nilsson, Simon et al. 1972, McIntosh, Pederson et al. 1981) und die von ihm stimulierte Säureproduktion des Magens.

4.4.4 Gastrointestinale Hormone und Ghrelinsekretion

Ein weiterer Regulierungsmechanismus ist die Wirkung endokriner Hormone auf das Ghrelin.

Stimulierend auf die Ghrelinsekretion wirkt vor allem das Gastric inhibitory Polypeptide (GIP), das postprandial von den K-Zellen des Duodenums und des proximalen Jejunums ausgeschüttet wird. GIP führt zu erhöhter Insulin- und Somatostatinausschüttung (McIntosh, Pederson et al. 1981, Dupre, Ross et al. 1973). Seine Sekretion wird durch die orale Aufnahme von Glukose stimuliert (Pederson, Schubert et al. 1975, Cataland, Crockett et al. 1974). Auch Gastrin führt in Versuchen bei der Ratte zu einer Erhöhung des Ghrelinspiegels (Murakami, Hayashida et al. 2002). Der stimulierende Effekt des Leptins auf die gastrale Ghrelinsekretion in Experimenten mit Mäusen (Ariyasu, Takaya et al. 2002, Toshinai, Mondal et al. 2003) konnte beim Menschen bislang noch nicht bestätigt werden. Zwar zeigen Menschen mit Leptin-Mangel ihrem BMI angemessen niedrigere Ghrelin-Spiegel (Haqq, Farooqi et al. 2003). Eine Studie an freiwilligen Testpersonen zeigte allerdings keine Auswirkung von Leptin in physiologischen und pharmakologischen Dosen auf die Ghrelinsekretion (Chan, Bullen et al. 2004). Leptin scheint Ghrelin also nicht alleine und unabhängig von Veränderungen des Körpergewichts regulieren zu können. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass Ghrelin im Kreislauf der Regulierung der Energiehomöostase vor dem Leptin steht.

Die meisten anderen gastrointestinalen Peptide wirken auf die Ghrelinproduktion inhibierend. Zu ihnen gehört das Insulin, das bereits besprochen wurde. Auch Somatostatin (Bakran, Dimaraki et al. 2003), das im Hypothalamus gebildet wird und die Gh-Ausschüttung inhibiert. Eine anorektische Wirkung ist bei diesem Peptid bekannt (Aponte, Leung et al. 1984).

Das Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) stimuliert die Insulinsekretion und ist ein physiologischer Sättigungsmediator. Seine Konzentration korreliert negativ mit der des Ghrelins, ein hemmender Einfluss wird vermutet (Asakawa, Inui et al. 2003).

4.4.5 Ghrelin und die Bluthirnschranke

Auch über die Menge des Ghrelins, die die Blut-Hirnschranke überschreitet, kann seine Wirkung reguliert werden. Ghrelin kann die Bluthirnschranke via aktivem Transport oder passiver Diffusion überqueren. Die Möglichkeit, die Bluthirnschranke zu durchqueren, hängt unter anderem vom Acylierungsstatus des Ghrelins ab.

Banks et al. konnten am Mausmodell zeigen, dass eine negative Korrelation zwischen Adipositas und dem Ghrelintransport über die Bluthirnschranke besteht. Zudem zeigten sie, dass Marker für Hungerszustände, bzw. Fettleibigkeit ebenfalls Einfluss auf diesen Transport haben, hohe Triglyceridkonzentrationen beschleunigen ihn beispielsweise (Banks, Burney et al., 2008).

5. Spezielle Diskussion - Das endogene Opioidsystem

5.1 Allgemein

Ghrelin spielt eine große Rolle bei der genussbedingten Nahrungsaufnahme. Hormone die ebenfalls das Belohnungszentrum im Gehirn beeinflussen sind unter anderem die endogenen Opioide. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob das endogene Opioidsystem die Ghrelinsekretion beeinflusst.

Zu den Opioiden zählt man Opioide mit Alkaloidstruktur, die Opiate (in der Regel exogene Opioide) und Opioide mit Peptidstruktur, die Opioidpeptide (in der Regel endogene Opioide). Beiden Gruppen ist eine agonistische Wirkung an den Opioidrezeptoren gemein.

Die ersten endogenen Opioide wurden 1975 von Hughes und Kosterlitz entdeckt. Es handelte sich dabei um die Gruppe der Enkephaline (Hughes, Smith et al. 1975). Wenig später wurden weitere Opioidpeptide, wie das β -Endorphin (Li, Chung et al. 1976) und das Dynorphin (Goldstein, Tachibana et al. 1979) gefunden.

Diese „typischen Opioidpeptide“ enthalten allesamt die N-terminale Aminosäuresequenz Tyr-Gly-Gly-Phe über die sie mit den Opioidrezeptoren in Verbindung treten.

„Atypische“ Opioidpeptide sind z.B. die β -Casomorphine, Fragmente des Milchproteins β -Casein (Kreil, Umbach et al. 1983) oder die Dermorphine, die in der Haut von Amphibien gefunden wurden (Broccardo, Erspamer et al. 1981). Sie binden und wirken ebenfalls an Opioidrezeptoren, verfügen jedoch mit Ausnahme des N- terminalen Tyrosinrestes nicht über die typische N- terminale Aminosäuresequenz der Opioidpeptide.

Alle typischen Opioidpeptide stammen von ausschließlich drei verschiedenen Precursormolekülen ab: Proopiomelanocortin (POMC), Proenkephalin (PENK) und

Prodynorphin (PDYN) (Garzon, Sanchez-Blasquez et al. 1983). Durch enzymatische Freisetzung werden aus diesen Molekülen die verschiedenen typischen Opioidpeptide abgespalten.

Von dem wohl bekanntesten Precursormolekül, dem Proopiomelanocortin, leiten sich das β -Endorphin (1-31) sowie die durch weitere Spaltung entstehenden Peptide α - und γ -Endorphin ab. Neben den Endorphinen werden auch die Hypophysenhormone ACTH (Adrenocorticotropes Hormon), α -, β - und γ -MSH (Melanozyten-stimulierendes Hormon) und β -LPH (Lipotropin) aus POMC freigesetzt. Die höchste Konzentration an POMC findet man im Hypophysenvorderlappen.

Aus dem Proenkephalin gehen die Enkephaline Met- und Leu- Enkephalin hervor. Die Dynorphine A und B sowie α - und β -Neoendorphin werden aus dem Prodynorphin gespalten. Die Peptide beider Gruppen lassen sich in verschiedenen Regionen des ZNS, im Nebennierenmark und im Plexus myentericus und submukosus nachweisen.

5.1.1 Opioid-Rezeptoren

Erkenntnisse aus Bindungsversuchen zeigen, dass mehrere Rezeptortypen und Subtypen existieren müssen, an die die einzelnen Opiode mit unterschiedlicher Affinität binden (Paterson et al., 1983).

Wie viele und welche Opioidrezeptoren es wirklich gibt, wird bis heute kontrovers diskutiert.

Als Opioidrezeptoren wurden 1976 die μ -, κ - und σ - Rezeptoren beschrieben (Martin et al., 1976); der δ -Rezeptor wurde 1977 erstmals nachgewiesen (Lord, Waterfield et al., 1977). Zwei Jahre später entstand das Modell der μ -, δ - und ϵ - Rezeptoren (Wüster, Schulz et al., 1979).

Der σ - Rezeptor wird in der neueren Literatur nicht mehr der Opioidrezeptorfamilie zugerechnet, weil seine Wirkung nicht durch den Opioidantagonisten Naloxon aufzuheben ist (Jenck, Quirion et al., 1987).

Nachdem die These eines ϵ - Rezeptors wiederholt verworfen wurde, legen es neuere Arbeiten nahe, den ϵ -Rezeptor als eigenständigen Rezeptortyp anzuerkennen (Shook,

Kazmierski et al., 1988; Nock, Giordano et al., 1993).

Allgemein akzeptiert und am besten untersucht sind die μ -, κ - und δ -Rezeptoren, die mittlerweile auch OP₃ (MOR), OP₂ (KOR) und OP₁ (DOR) genannt werden. Die Bezeichnung OP₁, OP₂ und OP₃ basiert auf die Reihenfolge, in der die drei Rezeptoren geklont wurden (Dhawan, Cesselin et al., 1996).

Eine neuere Entdeckung ist der ORL₁- Rezeptor (opioid receptor-like protein₁ receptor), der aufgrund seiner strukturellen Homologie zu den Opioidrezeptoren gezählt wird (Mollereau, Parmentier et al., 1994) und entsprechend der Chronologie der Entdeckung OP₄-Rezeptor genannt wird.

Die durch verschiedene Liganden ausgelösten Wirkungen lassen sich nicht eindeutig bestimmten Opioidrezeptoren zuordnen.

5.1.2 Wirkungsmechanismen der Opioid-Rezeptoren

Alle Opioid-Rezeptoren sind G-proteingekoppelte Rezeptoren (GPCRs) und binden durch Gi/Go-Proteine an ihre zellulären Effektoren (Milligan 2004). Sie übertragen die Wirkung der endogenen Opiode und der sich strukturell unterscheidenden Opiat-Alkaloide unter anderem auf das zentrale und das enterische Nervensystem (Kromer 1990; Nestler, Aghajanian 1997). Die drei Hauptklassen der Opioid-Rezeptoren werden anhand ihrer Affinität für die jeweiligen Opiode, bzw. Alkaloide unterschieden (Sternini 2001). Sie haben spezifische pharmakologische Profile und physiologische Funktionen, auch wenn sie sich in ihrer Verteilung, ihren Bindungsaffinitäten und ihrer Funktion überschneiden (Raynor, Kong et al. 1994). Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren stellen eine grosse und wandlungsfähige Gruppe von Rezeptoren dar, die eine Vielzahl von biologischen Funktionen vermitteln.

5.1.3 Opioiderge Systeme im Organismus

Opioidrezeptoren wurden in den verschiedensten Geweben und Zellen entdeckt. Im

Gehirn findet man eine hohe Dichte an μ - Rezeptoren, vor allem im Thalamus und Hypothalamus. δ - Rezeptoren und κ - Rezeptoren sind hauptsächlich im Bereich des Cortex lokalisiert und in höherer Konzentration im limbischen System (Atweh, Kuhar et al. 1983; Mansour, Watson et al. 1993).

Endorphine lassen sich in hohen Konzentrationen im hypothalamisch-hypophysären Bereich nachweisen. Enkephaline und Dynorphine sind dagegen über viele Regionen des ZNS verteilt (Dores, Khachaturian et al., 1984; Khachaturian, Lewis et al. 1985).

Außerhalb des ZNS werden opioidpeptidgerge Systeme im Herzen (Archelos, Xiang et al. 1987; Weihe, McKnight et al. 1983), im Gastrointestinaltrakt (Chamouard, Klein et al. 1993, Orvoll, Kendall et al. 1980), im Nebennierenmark (Lundberg, Hamberger et al., 1979) und im Immunsystem (Sibinga, Goldstein 1988) beschrieben.

Opioiderge Systeme greifen u.a. in Leitung und Verarbeitung der Schmerzempfindung ein und sind an der Regulation der Körpertemperatur beteiligt. Sie kontrollieren die Hormonsekretion, beeinflussen immunregulatorische und gastrointestinale Funktionsabläufe und sind an der Regulation des emotionalen Erlebens beteiligt, um nur einige physiologische Funktionen zu nennen. Im Rahmen dieser Arbeit, beschränke ich mich auf eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten gastrointestinalen und Wirkungen und den Einfluss auf das Essverhalten.

Die universelle Wirkung der Opiate und Opioid-Peptide besteht in der Unterdrückung der neuronalen Erregbarkeit (Wood 1980; Morita, North et al., 1981; 1982). Ihre Applikation führt zur Öffnung kaliumgesteuerter Ionenkanäle, erhöht so das Membranpotential und erschwert die Entstehung von Aktionspotentialen, die für die Ausschüttung der Neurotransmitter an den Synapsen nötig sind.

Grundsätzlich muss die Langzeitwirkung der Opioide von ihrer Akutwirkung unterschieden werden.

5.1.4 Der Gastrointestinaltrakt und das endogene Opioidsystem

Die endogenen Opioide sind im Gastrointestinaltrakt vor allem im enterischen Nervensystem und den chromaffinen Zellen zu finden (Burks 1995; Sternini, Patierno et

al. 2004). Sie beeinflussen die Motilität, die Sekretion und den Transport von Elektrolyten und Flüssigkeiten.

Der Hauptvermittler für die Opiatwirkungen im Intestinaltrakt ist der μ -Opioid-Rezeptor. Über ihn wird die opiatinduzierte Schwächung des gastrointestinalen Transits aber auch eine Vielzahl der Nebenwirkungen von opioidhaltigen Medikamenten, wie beispielsweise die Toleranzentwicklung übertragen (Loh, Tao et al. 1988; Reisine, Pasternak et al. 1996). Er wird von verschiedenen, funktionell unterschiedlichen enterischen Neuronen exprimiert. Beim Menschen wurde seine Präsenz in den Neuronen des submukösen und des myenterischen Plexus, sowie in den Zellen des Immunsystems in der Lamina propria nachgewiesen (Sternini, Patierno et al. 2004).

In vielen Versuchen wurde gezeigt, dass die Wirkung der endogenen Opiode auf die intestinale Motilität vor allem durch den μ - und den κ -Rezeptor vermittelt werden (Lynch, Grace et al. 1993; Nambu, Sakurai et al. 1999).

Morphin und andere Opiate induzieren im Gastrointestinaltrakt eine Obstipation, in dem sie nicht-propulsive Motilitätsmuster hervorrufen (Wood, Galligan et al. 2004). Dieser Effekt kommt zustande, weil Opiate die Neurotransmission in enteralen Ganglien inhibieren und den inhibitorischen neuronalen Input auf die Muskelzellen unterdrücken. So wird die normale Koordination von Kontraktion und Relaxion der glatten Muskeln des GIT gestört, die für die Propulsion des intraluminalen Inhalts nötig ist. (Wood, Galligan et al. 2004). Die Opiode wirken hierbei auf verschiedene Opioid-Rezeptoren, wie Studien mit isolierten Geweben aus dem menschlichen Darm gezeigt haben. δ -, κ - und μ -Rezeptoren tragen zur Opioid-induzierten Inhibition der Muskelaktivität bei (Shahbazian, Heinemann et al., 2002). Dies geschieht primär durch eine Unterbrechung der neuro-neuronalen und neuro-effektor Übertragung in den enterischen Nervenbahnen, die für die Muskelaktivität zuständig sind (Wood, Galligan et al., 2004; Sanger, Tuladhar et al. 2004; Holzer, 2007). Diese Blockierung kann prä- oder postsynaptisch erfolgen und hemmt die Freisetzung und die Wirkung der Transmitter (Wood, Galligan et al., 2004; De Luca, Coupar et al., 1996). Opioid-Rezeptoragonisten können sowohl die exzitatorischen als auch die inhibitorischen Nervenbahnen hemmen (Wood, Galligan et al., 2004). Die Unterdrückung der stimulierenden Impulse führt zu verminderter Freisetzung von exzitatorischen Transmittern wie Acetylcholin und blockiert die durch Dehnung induzierten, peristaltischen Kontraktionen. Eine Blockade der hemmenden Bahnen führt hingegen zu verminderter Stickstoff-Freisetzung aus inhibitorischen Motorneuronen und so zu einer Enthemmung

der gastrointestinalen Muskelaktivität mit Erhöhung des Grundmuskeltonus und nicht-propulsiven Bewegungsmustern (Wood, Galligan et al., 2004; Sanger, Tuladhar et al. 2004; Holzer, 2007; Kenard, Halmai et al., 1999).

Neben den direkten Angriffspunkten im ENS wirken Opiode zusätzlich noch auf Rezeptoren im Rückenmark und im ZNS um den intestinalen Transport zu verlangsamen (Galligan, Burks et al. 1983; Porreca, Burks et al. 1983; Jiao, Guo et al. 2002).

Bei den sekretomotorischen Neuronen des submucösen Plexus führt die Applikation von Opioiden und Opiaten zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials und unterdrückt die Erregbarkeit so weit, dass die Neurone keine Aktionspotentiale mehr entladen können. Das führt zu einer verminderten Sekretion und senkt den Flüssigkeitsgehalt des Dünndarminhalts (De Luca, Coupar et al., 1996; Holzer, 2007; Kurz, Sessler et al., 2003; Turnberg, 1983). Die Folge ist ein harter, trockener Stuhl, der noch weiter zu den obstipierenden Effekten der Opiate beiträgt.

Im Magen wird durch einen erhöhten Muskeltonus des Antrums und des Pylorus bei gleichzeitig vermindertem Ruhetonus des Korpus die Magenentleerung von flüssiger und fester Nahrung beim Menschen und beim Tier verringert (Yukioka, Rosen et al. 1987; Hammas, Thorn et al., 2001; Yuan, Foss et al. 1998).

In der Gallenblase führt die Gabe von Morphin zu einer fehlenden Relaxation des Sphinkter Oddi und dadurch zu einer Erweiterung des Duktus cysticus und des Duktus communis (Coelho, Senninger et al. 1986). Bei chronischer Verabreichung folgt daraus eine erhöhte Gefahr für Cholelithiasis (Figueroa-Colon, Tolaymat et al. 1990) und eine Verminderung der hepatischen Clearance.

5.1.5 Endogenes Opioidsystem und Appetitregulation

5.1.5.1 Genussbedingte Nahrungsaufnahme

Es ist unumstritten, dass die endogenen Opiode eine Rolle beim Essverhalten und der Appetitregulation spielen. Diese Wirkung üben die Opiode durch Interaktionen an den zentralen Opioid-Rezeptoren im Gehirn aus. Eine nicht-selektive Blockade der peripheren (Rogers, Frenk et al. 1978; Sangers, McCarthy et al. 1980) oder zentralen (Hynes, Gallagher et al. 1981) Opioid-Rezeptoren durch Naloxon führt zu einer verminderten

Nahrungsaufnahme, vor allem, wenn schmackhafte Nahrung angeboten wird (Apfelbaum, Mandenoff et al. 1981; Glass, Grace et al. 1996; Lynch, Libby et al. 1983). Eine direkte Applikation an den Nucleus accumbens, der neben der ventralen tegmental Area als Hauptstelle für die zentrale, appetitstimulierende Wirkung der Opiode gilt, führt zu einer Steigerung der Nahrungsaufnahme (Mucha, Iversen et al. 1986). Während man zunächst davon ausging, dass Opiode vor allem die Aufnahme von Fetten im Vergleich zu Kohlenhydraten erhöhen (Richter, Holt et al. 1938), zeigten Gosnell et al., dass behandelte Ratten die Aufnahme einer bereits zuvor bevorzugten Diät erhöhten. Ratten die zuvor Kohlenhydraten den Vorzug gaben, nahmen davon mehr zu sich und Ratten mit einer Vorliebe zu Fetten, steigerten die Aufnahme der Fette. (Gosnell, Krahn et al. 1990). Wurden die Diäten gleichzeitig angeboten, so erhöhte sich allerdings die Aufnahme der fettreichen Diät stärker (400%) als die der kohlenhydratreichen (75%) (Zhang, Gosnell et al., 1998).

Endogene Opiode beeinflussen neben dem zielgerichteten Verhalten der Nahrungsaufnahme auch die affektive Evaluation der Nahrung durch das jeweilige Individuum. Beim Menschen wurde gezeigt, dass die systemische Applikation eines nicht-spezifischen Opioid-Rezeptor-Blockers die Präferenz für Sucrose (Fantino, Hosotte et al. 1986) hemmt und die Beurteilung von Geruch und Geschmack von Nahrungsmitteln negativ beeinflusst (Yeomans, Wrigth et al., 1991). Menschliche Testpersonen berichteten nach Gabe des Opioid-Antagonisten Naltrexon über einen abnehmenden Genuss beim Trinken einer Zuckerlösung (Bertino, Beauchamp et al. 1991; Fantino, Hosotte et al., 1986).

Unter Opiodeinfluss hingegen zeigte sich eine erhöhte Aufnahme von Saccharose-Lösungen (Marks-Kaufmann, Balmagiya et al., 1984), die Wasseraufnahme wurde nicht beeinflusst.

Mehrere Studien beweisen, dass die Aufnahme schmackhafter Speisen die Opioidgen-Expression und das Bindungsverhalten der Rezeptoren beeinflusst (Welch CC et al, 1996). Die Aufnahme einer weniger schmackhaften Nahrung mit gleichem kalorischem Wert führt zur Senkung der Genexpression, ähnlich dem Zustand bei Hungerzuständen.

Opiode scheinen zudem eine Rolle bei der Aufrechterhaltung einer Mahlzeit zu spielen. Sie beeinflussen den Antrieb zur Nahrungsaufnahme nicht, zögern aber das Sättigungsgefühl hinaus. Kirkham and Blundell (Kirkham TC et al, 1988) zeigten, dass Naloxon bei Ratten, die zu einer Zielbox rennen mussten, um Nahrung zu bekommen, die

Geschwindigkeit und den Antrieb diese Box zu erreichen nicht beeinflusst, aber die Nahrungsmenge reduziert.

5.1.5.2 Strukturelle Grundlagen der Opioidwirkung auf den Appetit

Kelley et al präzisieren diese Ergebnisse weiter. In ihren Forschungsarbeiten konnten sie zeigen, dass die endogenen Opiode des Striatums eine besondere Rolle bei den hedonistischen Aspekten der Nahrungsaufnahme spielen. Das Striatum enthält die endogenen Opiode Enkephalin und β -Endorphin (Sweep, Wiegant et al., 1989; Pickel, Sumal et al., 1980) und viele Opioid-Rezeptoren (Mansour, Khachaturian et al., 1987). Es besteht aus mehreren Parallelkreisläufen, die an verschiedenen kognitiven und motorischen Leistungen beteiligt sind. Die direkte, intracranielle Injektion von Morphin in hohen Dosen (bis zu 20 μ g/Injektionsort) in 5 verschiedenen Regionen des Striatums führt zu einem signifikanten Anstieg der Nahrungsaufnahme wie oben beschrieben. Am sensitivsten sind der Ncl. Accumbens und das umgebende Striatum (Kelley, Baldo et al., 2005).

μ -, δ - und κ -Opioid-Rezeptoren und ihre mRNA können im gesamten Striatum gefunden werden, vermehrt in der Rindenregion des Ncl. Accumbens und dem angrenzenden Ncl. Caudatus, also Regionen, die gustatorischen Input aus dem Cortex bekommen (Mansour, Khachaturian et al., 1987; Delfs, Kong et al., 1994). In Versuchen wurde gezeigt, dass eine Stimulation der μ -Rezeptoren den stärksten Anstieg der Nahrungsaufnahme bewirkt, gefolgt von δ -Rezeptoren (Cooper, Kirkham et al., 1993; Bodnar, Glass et al., 1995). Eine Stimulation der κ -Rezeptoren veränderte die Nahrungsaufnahme nicht (Bakshi, Kelley et al., 1993). Auch hier zeigten sich die signifikantesten Veränderungen, wenn der Nucleus Accumbens stimuliert wurde. Die Antagonisierung von μ -Rezeptoren führte zu verminderter Nahrungsaufnahme (Kelley, Bless et al., 1996).

In weiteren Versuchen wurde untersucht ob diese vermehrte Nahrungsaufnahme unter Aspekten der Genussgewinnung oder Kaloriengewinnung geschah. Auch hier zeigte sich, dass eine Stimulation der μ -Rezeptoren des Striatums zu einer vermehrten Aufnahme schmackhafter Lösungen ohne nutritiven Gehalt führte (Zhang, Kelley et al., 2002). Auch elektrophysiologische Studien, die die Entladungsmuster der Neuronen des Nucleus

Accumbens bei der Aufnahme schmackhafter Speisen maßen, unterstreichen diese Rolle (Taha, Field et al., 2005).

Zusammenfassend zeigen die Studienergebnisse der letzten Jahre, dass das opioiderge System die Nahrungsaufnahme über ein weitverzweigtes Regelwerk beeinflusst. Opioid-Rezeptoren sind entlang der meisten neuronalen Nervenbahnen zu finden, von denen man weiss, dass sie Geschmacksinformationen an das Gehirn vermitteln (Mansour, Khachaturian et al., 1987; Aicher, Goldberg et al., 2000; Xia, Haddad et al. 1991; Glass, Billington et al. 1999).

Eine Schlüsselrolle spielen die μ -Rezeptoren des Striatums. Ihre Aktivierung zeigt Effekte auf verschiedenen Leveln des Regelkreises, einbezogen Regionen, die für die Geschmackswahrnehmung wichtig sind (Tractus solitarius), die den Belohnungsfaktor von Nahrung bewerten (Amygdala, ventrales Tegmentum) und die die Nahrungsaufnahme unter dem Aspekt des Energiegewinns modulieren (Hypothalamus). Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob sie auch durch Beeinflussung der gastralen Ghrelinsekretion die Nahrungsaufnahme beeinflussen.

5.2 Wirkung spezifischer endogener Opioide auf die Ghrelinsekretion

5.2.1 Pro-opiomelanocortin (POMC) - Endorphine

Das Pro-opiomelanocortin stellt eine multifunktionale Opioid-Vorstufe dar. Es wird zu Melanocortinen (ACTH, α -, β -, γ -melanozytenstimulierendes Hormon) und zu β -Endorphin weiter verarbeitet und ist über diese Endprodukte in der Lage die Ausschüttung von ACTH und dem Melanozyten-stimulierenden Hormon MSH zu erhöhen. Auch Fragmente des β -Endorphins, wie β -Endorphin (1-27) sind biologisch relevant.

β -Endorphin ist ein wichtiger Mediator und wird vom Gehirn, bzw. der Hypophyse ausgeschüttet. Es hat eine starke Affinität zu μ - und δ -Rezeptoren und eine geringere zu κ -Rezeptoren (Corbett, Henderson et al. 2006).

Die POMC-Neuronen liegen zentral vor allem im Nucleus arcuatus des Hypothalamus und im kaudalen Nucleus des Tractus solitarius des Hirnstamms (Hetherington, Vervaeke et al. 1991), also zwei für die Steuerung der Nahrungsaufnahme wichtigen Regionen (Holtzman 1979; Cooper 1983; Reid 1985).

Die POMC-Neurone des Nucleus arcuatus spielen eine Schlüsselrolle bei der Energiehomöostase. Sie integrieren periphere und zentrale Informationen über die Kalorien-Balance und den Metabolismus (Kalra, Dube et al. 1999; Schwartz, Woods et al. 2000).

Das zentrale Melanocortinsystem besteht aus Nervenbahnen, die einerseits das hypothalamische Neuropeptid Y und das Agouti-related protein (NPY/AgRP) exprimieren oder das POMC, daneben Nervenbahnen, die POMC-Neurone aus dem Tractus solitarius des Hirnstamms enthalten und schliesslich Nervenbahnen, die zu den Endzielen dieser POMC und AgRP Neuronen führen und Melanocortin 3- und 4 Rezeptoren exprimieren (Cone et al, 2005).

Im ZNS sind die Melanocortine Agonisten dieser Rezeptoren, während AgRP dort antagonistisch wirkt. Eine Vielzahl von Defekten in diesem System resultiert in Fettleibigkeit (Yaswen, Diehl et al. 1999, Ollmann et al. 1997)

Hinweise, dass dieses POMC-System mit Ghrelin in Zusammenhang steht gibt es viele. Ghrelin scheint in die Nahrungsaufnahme hauptsächlich dadurch zu steuern, dass es die orexigenen NPY/AgRP Neurone aktiviert. Der Ghrelin-Rezeptor GHS-R wurde auf Neuronen des Ncl. Arcuatus gefunden (Willesen, Kristensen et al. 2005). Wird es peripher oder in den Hypothalamus injiziert, zeigt sich eine Stimulierung der cFOS-Expression nur in den NPY/AgRP Neuronen des Ncl. Arcuatus und nicht an anderen Stellen, wie dem Hypothalamus oder dem Gehirnstamm (Wang, Saint-Pierre et al. 2002). Wird der Ncl. Arcuatus experimentell zerstört, blockiert das die Auswirkungen des Ghrelins auf das Essverhalten, aber nicht beispielsweise die ebenfalls von ihm vermittelte erhöhte Sekretion des Growth Hormones (Tamura et al. 2002).

Neben dieser direkten zentralen Wirkung auf die NPY-Neurone des Ncl. Arcuatus wirkt peripheres Ghrelin auch über den Vagus wie bereits bekannt (Date et al. 2002).

POMC wird, wie erwähnt in verschiedene Peptidhormone gespalten, unter anderem zu Melanocortinen (ACTH und MSH) und β -Endorphin. Beide Neuropeptide werden gemeinsam am Axonenende ausgeschüttet (Castro and Morrison 1997). Die Melanocortine haben anorektische Effekte und spielen eine wichtige Rolle bei der Energiehomöostase. Sie wirken in erster Linie am MC4-Rezeptor (Huszar, Lynch et al. 1997).

Während die zentrale Verknüpfung des POMC-Systems mit der Ghrelinwirkung bereits bekannt ist, wurde in dieser Arbeit die periphere Wirkung des β -Endorphins auf die

Ghrelinsekretion separat untersucht. Dass die Effekte des β -Endorphins und die der Melanocortine unabhängig von einander sind, zeigten Castro et al. bereits 1997 (Castro and Morrison 1997).

Die Diskrepanzen zwischen pharmakologischen und genetischen Studien zeigen die unterschiedlichen Effekte der Opioid-Agonisten auf die Kurz- und Langzeitregulation.

So führt eine intrahypothalamische Injektion von β -Endorphin zu Initiation der Nahrungsaufnahme (Grandison, Guidotti et al. 1977). Die kurzzeitige Nahrungsaufnahme wird erhöht; die langzeitige jedoch nicht (Levine and Billington 1989; de Zwaan and Mitchell 1992). Auch die genetische Entfernung des β -Endorphins enthüllte eine langfristige anorektische Wirkung der Peptide, im Gegensatz zu ihren kurzzeitigen orexigenen Effekten.

In Studien wurde gezeigt, dass Mäuse, denen das endogene Opioid-Peptid β -Endorphin fehlt, einen sexuell dimorphen, fettleibigen Phänotyp haben. Diese Adipositas scheint von Veränderungen bei der Kalorienaufnahme und nicht des Energieverbrauchs zu kommen (Appleyard, Hayward et al. 2003)

In den durchgeführten Untersuchungen konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem peripher applizierten β -Endorphin und der gastralen Sekretion des Ghrelins gefunden werden. Es zeigte sich jedoch eine Tendenz zu einer verminderten Ghrelin-Ausschüttung, was im Einklang mit der anorektischen Wirkung steht. Ein Teil der verminderten Nahrungsaufnahme könnte somit durch die verminderte Appetitstimulation aufgrund des niedrigen Ghrelinspiegels verursacht werden.

5.2.2 Prodynorphin - Dynorphine

Prodynorphin, ein Protein mit 256 Aminosäuren, bildet die Vorstufe des Dynorphins, einem potenten endogenen Opioid und anderer (Leu)enkephalin-enhaltender Peptide. Es enthält die Sequenz von Dynorphin A, einem Heptadecapeptid, das von Goldstein et al (Goldstein, Tachibana et al. 1979; Goldstein, Fischli et al. 1981) und Tachibana et al (Tachibana, Araki et al. 1982) entdeckt wurde. Daneben existiert noch ein weiteres Dynorphin-ähnliches Peptid, Dynorphin B, das von Fischli et al zuerst beschrieben wurde (Fischli, Goldstein et al. 1982). Die Opiode, die sich von Prodynorphin ableiten, haben eine hohe Affinität zu κ -Rezeptoren. Dynorphin A stellt den potentesten κ -Agonisten dar,

besitzt aber auch eine signifikante Affinität zu μ - und δ -Rezeptoren (Corbett, Gillan et al. 1984).

Zudem haben Dynorphine auch nicht-opioide Wirkungen, die sie über direkte Bindung an den NMDA-Rezeptoren entfalten.

Zamir et al. beschrieb die Verteilung des Dynorphin A und Dynorphin B im zentralen Nervensystem der Ratte (Zamir, Palkovits et al. 1983; Zamir, Palkovits et al. 1984). In den meisten Gehirnregionen ist der Level des Dynorphin B wesentlich höher als der des Dynorphin A, obwohl das Verhältnis der beiden Peptide im Vorgängerpeptid 1:1 ist. Es ist in Hippocampus, Amygdala, Hypothalamus, Striatum und dem Rückenmark zu finden und bei Gedächtnis, Emotionen, Stress und Schmerzempfinden so wie bei der Entwicklung von Sucht, Depression, Schizophrenie und chronischen Schmerzzuständen beteiligt.

Im peripheren Gewebe wurde Dynorphin A von Spampinato et al. im gesamten menschlichen Gastrointestinaltrakt, vor allem im Magen und im Dünndarm in höheren Konzentrationen, gefunden. Gewebeproben zeigten, dass es in der Muscularis externa, der Submucosa und der Mucosa gleich verteilt ist (Spampinato, Ferri et al., 1988).

In Studien wurde gezeigt, dass eine Dynorphin-Zufuhr bei gesättigten Ratten die Nahrungsaufnahme erhöht und dieser Effekt durch Naloxon antagonisierbar ist (Morley and Levine 1981; Morley and Levine 1983; Morley, Levine et al. 1983).

Bei Stresssituationen, die mit Nahrungsaufnahme verknüpft sind, z.B. Hunger oder insulininduzierter Hypoglykämie führen zu einer Erhöhung der kortikalen Dynorphinkonzentration (Morley, Levine et al. 1982). Man geht deshalb von einer spezifischen Rolle des Dynorphins und der κ -Rezeptoren bei der Ernährung aus (Morley and Levine 1983).

In dieser Studie konnte kein Effekt von Dynorphin auf die Ghrelinsekretion gezeigt werden. Dynorphin scheint also über einen anderen Weg die Nahrungsaufnahme zu stimulieren.

5.2.3 Pronociceptin/Orphanin FQ – Nociceptin/Orphanin-FQ

Pronociceptin/Orphanin FQ bildet die Vorstufe des Nociceptin/Orphanin-FQ, dem endogenen Liganden des ORL₁-Rezeptors. Der ORL₁-Rezeptor ist den klassischen Opioid-Rezeptoren sehr ähnlich, vor allem dem κ -Rezeptor. Er wirkt über dieselben

Signaltransduktionswege wie Inhibition der Adenylatcyclase, Aktivierung von Kaliumkanälen und/oder Inhibierung von Kalziumkanälen (Meunier 1997; Lachowicz, Shen et al. 1995). Nociceptin wurde 1995 gleichzeitig von Meunier et al und Civelli et al. entdeckt (Henderson, McKnight et al. 1997). Sein Name kommt von seiner Eigenschaft, die Wahrnehmungsschwelle für schmerzhafte Stimuli zu senken. Es besteht aus 17 Aminosäuren und ähnelt von seiner Struktur her den Dynorphinen, allerdings fehlt ihm das N-terminale Tyrosin, das für die Aktivierung von Opioid-Rezeptoren notwendig ist (Lapalu, Moisand et al. 1997; Reinscheid, Higelin et al. 1998). Dieser kleine Unterschied beeinflusst die Rezeptorselektivität des Peptides stark, da Nociceptin/orphani-FQ praktisch keine Affinität für μ -, δ -, und κ - Rezeptoren hat und nur an den ORL₁-Rezeptor bindet (Sim, Xiao et al. 1996). Nociceptin wird zentral in den Neuronen vieler Hirnregionen die für die Nahrungsaufnahme verantwortlich sind gebildet, beispielsweise des Striatums, des Hypothalamus und des Hirnstamms (Manaka, Manaka et al. 1989; Fox-Threlkeld, Manaka et al. 1991), sowie im Rückenmark. Im peripheren Gewebe wird es vor allem im Gastrointestinaltrakt, der Milz und der Vasa deferentia gefunden (Schulz, Schreff et al. 1996; Yazdani, Takahashi et al. 1997). Auch der ORL₁-Rezeptor ist in diesen Strukturen zu finden (Manaka, Manaka et al. 1989; Fox-Threlkeld, Manaka et al. 1991).

Die zentrale Wirkung des Nociceptins betrifft in erster Linie die Schmerzmodulation. Es kann die analgetische Wirkung der Opiode antagonisieren, wenn es intracerebral appliziert wird (Meunier, Mollereau et al. 1995; Reinscheid, Nothacker et al. 1995). In mehreren Studien an der Ratte wurde aber auch ein milder orexigener Effekt des Nociceptins bei zentraler Gabe belegt (Pomonis, Billington et al. 1996; Stratford, Holahan et al. 1997). Dieser ist in seiner Ausprägung dem appetitstimulierenden Effekt der Opiode sehr ähnlich und durch peripher injiziertes Naloxon sowie intracerebral injiziertes Naltrexon antagonisierbar. (Pomonis, Billington et al. 1996). Anders als die Opiode spielt das Nociceptin allerdings keine Rolle bei der genussbedingten Nahrungsaufnahme (Olszewski, Grace et al. 2001). Osinki et al. zeigten, dass eine intracerebrale Applikation bei Mäusen zu einer dosisabhängigen Hemmung der propulsiven Aktivität des Colons, sowie zu einer verlangsamten Entleerung des Magens und des Dünndarms führt (Osinki, Bass et al. 1999).

Bei Versuchen mit isolierten Colonsstücken der Ratte und der Maus konnte gezeigt werden, dass hier bei peripherer Applikation eine dosisabhängige Zunahme der

Kontraktion erfolgt. Dies wird vermutlich durch eine Inhibition des inhibitorischen, purinergen Signalwegs im Plexus myentericus verursacht (Osinski, Bass et al. 1997). Lippl et al. konnten am isolierten Rattenmagen eine inhibitorische Wirkung des Nociceptins auf die Somatostatin-Sekretion zeigen (Lippl, Schusdziarra et al. 2001). Eine Wirkung auf die gastrale Ghrelinsekretion konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

5.2.4 Endomorphine

Über 25 Jahre nach der Isolation und Charakterisierung des Enkephalins, wurden zwei Tetrapeptide mit Amid-Strukturen am C-terminalen Ende aus dem Gehirn extrahiert (Zadina, Hackler et al. 1997), Endomorphin 1 und Endomorphin 2. Beide haben einen Tyrosin-Rest am N-Terminus, aber sonst keine strukturellen Beziehungen zu den Enkephalinen. Sie besitzen eine äußerst hohe Affinität und Selektivität für den μ -Rezeptor im ZNS. Man nimmt an, dass es sich um die endogenen μ -Rezeptor-Agonisten handelt (Zadina, Hackler et al. 1997). Zentral wird Endomorphin in mehreren Regionen des Gehirns exprimiert, einschliesslich dem Thalamus, dem Hypothalamus, dem Striatum und dem frontalen Kortex (Martin-Schild, Gerall et al. 1999, Zadina, Hackler et al. 1997). Im gastrointestinalen Trakt stimulieren die Endomorphine selektiv den μ -Rezeptor in den exzitatorischen Neuronen des Plexus myentericus (Tonini, Fiori et al. 1998). Ausserdem haben sie eine inhibitorische Wirkung auf die Acetylcholinausschüttung des Plexus (Nishiwaki, Saitoh et al. 1998). Lippl et al. konnten eine dosisabhängige Reduktion der gastralen Somatostatin-Sekretion am isolierten Rattenmagen nachweisen (Lippl, Schusdziarra et al. 2001).

Ein Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme wurde bei diesen Peptiden nicht festgestellt. In dieser Arbeit konnte keine signifikante Rolle des Endomorphins bei der Ghrelinsekretion nachgewiesen werden.

6. Zusammenfassung

Das 1999 von Kojima et al entdeckte Peptidhormon Ghrelin stellt bislang das einzige periphere humorale Hungersignal dar. Der Hauptproduktionsort des Ghrelins ist der Magen (Ariyasu, Takaya et al. 2001).

Seine Wirkung entfaltet Ghrelin durch eine spezielle Acyl-Modifikation, die es ihm erlaubt, an dem GHS-Rezeptor 1a zu binden (Kojima, Hosoda et al. 1999; Bednarek, Feighner et al. 2000; Matsumoto, Kitajima et al. 2001). Das Enzym, das für diese Modifikation verantwortlich ist, heisst Ghrelin O-Acyltransferase (GOAT) und wurde erst vor kurzem entdeckt (Gutierrez, Solenberg et al. 2008; Yang, Brown et al. 2008).

Neben der appetitsteigernden Wirkung hat es auch Einfluss auf andere Regelkreise. Es stellt den wirkungsvollsten derzeit bekannten Stimulator der GH-Ausschüttung dar (Hataya, Akamizu et al. 2001; Pombo, Pombo et al. 2001). Es führt im gastrointestinalen System zu einer verstärkten Magensäureproduktion und erhöht die gastrointestinale Motilität (Date, Kojima et al. 2000; Masuda, Tanaka et al. 2000). Im kardiovaskulären System hat es einen positiven Einfluss auf die Hämodynamik (Nagaya, Kojima et al. 2001; Enomoto, Nagaya et al. 2003) und wirkt kardioprotektiv nach Ischämie (Chang, Ren et al. 2004).

Die appetitstimulierende Wirkung übt Ghrelin zentral über den Nucleus arcuatus, einem wichtigen Knotenpunkt für die Energiehomeostase aus. Ghrelin-enthaltende Nervenfasern sind im Gehirn weitverbreitet (Kojima, Hosoda et al. 1999; Lu, Guan et al. 2002; Cowley, Smith et al 2003).

Die Regulation der Ghrelinsekretion ist noch nicht vollständig verstanden.

Beim Menschen beträgt die Konzentration des Gesamtghrelins im Blut 100-150 fmol/ml (Yoshimoto, Mori et al. 2002; Hosoda, Kojima et al. 2000). Der Ghrelin-Level steigt unter Fastenbedingungen, und fällt bei Nahrungsaufnahme (Cummings, Purnell et al. 2001; Tschop, Wawarta et al. 2001). Dieses präprandiale Ansteigen wird als Signal zur Nahrungsaufnahme gewertet. Für die kurzfristige Regulation scheint die Nahrungszusammensetzung von Bedeutung zu sein (Erdmann, Lippl et al. 2003).

Der Ernährungszustand des Individuums hat aber auch Einfluss auf den Ghrelinspiegel. Es besteht eine negative Korrelation mit dem Body-Mass-Index. Bei adipösen Menschen ist das Ghrelin vermindert, bei anorektischen hingegen erhöht (Tschop, Weyer et al. 2001; Ariyasu, Takaya et al. 2001). Es ist offensichtlich, dass Ghrelin eine wichtige Rolle bei der Lang- und Kurzzeitkontrolle des Energiehaushaltes spielt.

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die Regulation der Ghrelinsekretion zu erlangen.

Aus mehreren Studien ist bekannt, dass Opiode einen Einfluss auf die Wahl der Nahrung haben und die Aufnahme von schmackhafter Nahrung begünstigen (Welch et al. 1996; Zhang, Gosnell et al. 1998). Einzelne Autoren sprechen sogar von der Adipositas als eine Art Autoaddiction für endogene Opiode (McCloy, McCloy 1980).

Opiode wirken überwiegend zentral. Es gibt aber auch Hinweise über periphere Wirkungen. Eine Verbindung zwischen dem endogenen Opioidsystem und der Ghrelinsekretion scheint somit wahrscheinlich. In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob die endogenen Opiode das Essverhalten auch durch Beeinflussung der Ghrelinfreisetzung steuern. Deshalb wurde in diesen Versuchen ihre Wirkung auf die Ghrelinsekretion am isolierten Rattenmagen *in vitro* untersucht.

Unter vagaler Prästimulation wurden verschiedene endogene Opiode geprüft, die unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen Opiatrezeptoren haben.

Die Applikation des δ -Agonisten β -Endorphin führte zu keinen signifikanten Veränderungen, aber zu tendenziell verminderter Ghrelinausschüttung, was in Einklang mit der bekannten anorektischen Wirkung des β -Endorphin steht. .

Der κ -Agonist Dynorphin zeigte keinen Effekt auf die Ghrelinsekretion, so dass davon auszugehen ist, dass Dynorphin *in vitro* keine Rolle für die Ghrelinsekretion besitzt.

Die Applikation des ORL-1 Agonisten Nociceptin und des μ -Agonisten Endomorphin führte zu keinen signifikanten Veränderungen.

Es konnten im Rahmen dieser Arbeit keine signifikanten Zusammenhänge gezeigt werden, die eine Einflussnahme der endogenen Opioide auf die gastrale Ghrelinsekretion bestätigen. Die Opioide haben am Modell des isoliert perfundierten Rattenmagens keinen direkten Einfluss auf die Ghrelinsekretion.

Eine Wechselwirkung zwischen Opioiden und Ghrelin im ZNS scheint eher wahrscheinlich und muss in weiteren Studien evaluiert werden.

7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1:	Versuchsschema zur Ausstestung der Wirkung elektrischer Vagusstimulation bei 10 Hz über einen Zeitraum von 40 Minuten.	16
Abbildung 2:	Versuchsschema zur Austestung verschiedener gastrointestinaler Hormone unter elektrischer Prästimulation des N.vagus bei 10 Hz.	17
Abbildung 3:	Versuchsschema zur Austestung verschiedener gastrointestinaler Hormone unter elektrischer Prästimulation des N.vagus bei 10 Hz und unter Einwirkung von Naloxon in verschiedenen Konzentrationen.	18
Abbildung 4:	Effekte der in vitro-Endomorphinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-8} M auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens.	22
Abbildung 5:	Effekte der in vitro-Endomorphinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-10} M auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens.	23
Abbildung 6:	Effekte der in vitro- β -Endorphinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-7} M auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens.	24
Abbildung 7:	Effekte der in vitro- β -Endorphinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-9} M auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens.	24
Abbildung 8:	Effekte der in vitro- β -Endorphinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-10} M auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens.	25
Abbildung 9:	Effekte der in vitro- β -Endorphinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-7} M auf die Ghrelinfreisetzung ohne Vagusstimulation.	26
Abbildung 10:	Effekte der in vitro- β -Endorphinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-9} M auf die Ghrelinfreisetzung ohne Vagusstimulation.	26

Abbildung 11: Effekte der in vitro-Nociceptinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-7} M auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens.	27
Abbildung 12: Effekte der in vitro-Nociceptinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-9} M auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens.	28
Abbildung 13: Effekte der in vitro-Dynorphinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-7} M auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens.	29
Abbildung 14: Effekte der in vitro-Dynorphinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-9} M auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens.	30
Abbildung 15: Effekte der in vitro-Dynorphinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-7} M auf die Ghrelinfreisetzung ohne Vagusstimulation.	31
Abbildung 16: Effekte der in vitro-Dynorphinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-9} M auf die Ghrelinfreisetzung ohne Vagusstimulation.	31
Abbildung 17: Effekte der in vitro-Naloxonapplikation bei einer Konzentration von 10^{-5} M auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens.	32
Abbildung 18: Effekte der in vitro-Naloxonapplikation bei einer Konzentration von 10^{-6} M, sowie einer gleichzeitigen 20minütigen Endomorphinapplikation in einer Konzentration von 10^{-8} M auf die Ghrelinfreisetzung des vagal-vorstimulierten Magens.	33
Abbildung 19: Strukturformel des Ghrelins	35
Tabelle 1: Herkunftsverzeichnis der verwendeten Substanzen	14
Tabelle 2: Übersicht über die beim Menschen nachgewiesenen Ghrelinderivate	37
Tabelle 3: Dendrogramm der Superfamilie des Ghrelinrezeptors	41

8. Literaturverzeichnis

- Adeghate, E. and A. S. Ponery (2002). "Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats." *J Neuroendocrinol* **14**(7): 555-60.
- Aicher, S.A., A. Goldberg, S. Shamas, VM. Pickel (2000). "Mu-opioid receptors are present in vagal afferents and their dendritic targets in the medial nucleus tractus solitarius." *J Comp Neurol*; 422(2): 181-90.
- Akil, H., S. J. Watson, E. Young, ME. Lewis (1984). "Endogenous opioids: biology and function." *Annu Rev Neurosci* **7**: 223-55.
- Anderson, L. L., S. Jeftinija, CG. Scanes (2004). "Growth hormone secretion: molecular and cellular mechanisms and in vivo approaches." *Exp Biol Med (Maywood)* **229**(4): 291-302.
- Apfelbaum, M., A. Mandenoff (1981). "Naltrexone suppresses hyperphagia induced in the rat by a highly palatable diet." *Pharmacol Biochem Behav* **15** 89-91.
- Aponte, G., P. Leung (1984). "Effects of somatostatin on food intake in rats." *Life Sci.* **41**, 508-511.
- Appleyard, S.M., M. Hayward, JI. Young, AA. Butler, RD. Cone, M. Rubinstein, MJ. Low (2003). "A role for the endogenous opioid beta-endorphin in energy homeostasis." *Endocrinology*, **144**(5):1753-60
- Archelos, J., J. Xiang, M. Reinecke, RE. Lang (1987). "Regulation of release and function of neuropeptides in the heart." *J. Cardiovasc Pharmacol. Suppl.* **12** S45-55.
- Argente, J., L. M. Garcia-Segura, J. Pozo, JA. Cowen (1996). "Growth hormone-releasing peptides: clinical and basic aspects." *Horm Res* **46**(4-5): 155-9.
- Argetsinger, L. S. and C. Carter-Su (1996). "Mechanism of signaling by growth hormone receptor." *Physiol Rev* **76**(4): 1089-107.
- Ariyasu, H., K. Takaya, H. Hosoda, H. Iwakura, K. Ebihara, K. Mori, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao (2003). "Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidence by a specific ria for the active form of ghrelin." *Endocrinology* **143** 3341-3350.
- Ariyasu, H., K. Takaya, T. Tagami, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Suda, T. Koh, K. Natsui, S. Toyooka, G. Shirakami, T. Usui, A. Shimatsu, K. Doi, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa (2001). "Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(10): 4753-8.
- Arora, S. (2006). "Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity - A review." *Neuropeptides* **40**: 375-401
- Arvat, E., L. Di Vito, F. Broglio, M. Papotti, G. Muccioli, C. Dieguez, FF. Casanueva, R. Deghenghi, D. Camanni, E. Ghigo (2000). "Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans." *J Endocrinol Invest* **23**(8): 493-5.
- Arvat, E., M. Maccario, L. Di Vito, F. Broglio, A. Benso, C. Gottero, M. Papotti, G. Muccioli, C. Dieguez, FF. Casanueva, R. Deghenghi, F. Camanni, E. Ghigo (2001). "Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a non natural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(3): 1169-74.
- Asakawa, A., A. Inui, T. Kaga, H. Yuzuriha, T. Nagata, N. Ueno, S. Makino, M. Fujimiya, A. Nijima, MA: J'Fujina, M. Kasuga (2001). "Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin." *Gastroenterology* **120**(2): 337-45.

- Asakawa, A., A. Inui, T. Kaga, G. Ktsuura, M. Fujimiya, MA. Fujino, M. Kasuga (2003). "Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice." *Gut* 52: 947-952.
- Atweh, S., M. Kuhar (1938). "Distribution and physiological significance of opioid-receptors in the brain." *Br Med Bull* 39(1):47-52.
- Bakshi, V.P., A.E. Kelley (1993). "Feeding induced by opioid stimulation of the ventral striatum: role of opiate receptor subtypes." *J Pharmacol Exp Ther*; 278(3):1499-507.
- Baldanzi, G., N. Filigheddu, S. Cutrupi, F. Catapano, S. Bonissoni, A. Fubini, D. Malan, G. Baj, R. Granata, F. Broglio, M. Papotti, N. Surico, F. Bussolino, J. Isgaard, R. Deghengi, F. Sinigaglia, M. Prat, G. Muccioli, E. Ghigo, A. Graziani (2002). "Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT." *J Cell Biol* 159(6): 1029-37.
- Banks, W.A., B.O. Burney, SM. Robinson (2008). "Effects of triglycerides, obesity and starvation on ghrelin transport across the blood-brain barrier." *Peptides*; 29 (11):2061-5
- Barkan, A.L., E.V. Dimaraki, SK. Jessup, KV. Symons, M. Ermolenko (2003). "Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the absent growth hormone levels." *J. Clin.Endocrinol. Metab.* 88: 2180-2184.
- Barreiro, M. L., F. Gaytan, JE. Caminos, L. Pinilla, FF. Casanueva, E. Aguilar, C. Diéguez, M. Tena-Sempere (2002). "Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis." *Biol Reprod* 67(6): 1768-76.
- Beaumont, N. J., V. O. Skinner, TM. Tan, BS. Ramesh, DJ. Byrne, GS. MacColl, JN. Keen, PM: Bouloux, DP. Mikhailidis, KR., Vanderpump, KS, Srai (2003). "Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase." *J Biol Chem* 278(11): 8877-80.
- Bednarek, M. A., S. D. Feighner, SS. Pong, KK. McKee, DL. Hreniuk, MV. Silva, VA. Warren, AD: Howard, LH. Van der Ploeg, JV. Heck (2000). "Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a." *J Med Chem* 43(23): 4370-6.
- Bellone, S., A. Rapa, D. Vivenza, N. Castellino, A. Petri, J. Bellone, E. Me, F. Broglio, F. Prodam, E. Ghigo, G. Bona (2002). "Circulating ghrelin levels as function of gender, pubertal status and adiposity in childhood." *J Endocrinol Invest* 25(5): RC13-5.
- Bennett, P. A., G. B. Thomas, AD. Howard, SD, Feighner, LH. van der Ploeg, RG. Smith, IC. Robinson (1997). "Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat." *Endocrinology* 138(11): 4552-7.
- Berthoud, H., (2008): "Vagal and hormonal gut-brain communication: from satiation to satisfaction." *Neurogastroenterol Motil* 20 (Suppl.1) 64-72
- Bertino, M., G.K. Beauchamp (1991). "Naltrexone, an opiate blocker alters taste perception and nutrient intake in humans." *Am J Physiol*; 261:R59-63.
- Berzetei-Gurske I., R. Schwartz (1996). "Determination of activity for nociceptin in the mouse vas deferens." *EurJ Pharmacol* 302:R1-2.
- Blake, A. D. and R. G. Smith (1991). "Desensitization studies using perfused rat pituitary cells show that growth hormone-releasing hormone and His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ stimulate growth hormone release through distinct receptor sites." *J Endocrinol* 129(1): 11-9.
- Bodnar, R.J., M.J. Glass, A. Ragnauth, ML. Cooper (1995). "General, mu and kappa opioid antagonists in the nucleus accumbens alter food intake under deprivation, glucoprivic and palatable conditions." *Brain Res*:700 (1-2):205-12.

- Bowers, C. Y., F. Momany, GA. Reynolds, D. Chang, A. Hong, K. Chang (1980). "Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro." *Endocrinology* **106**(3): 663-7.
- Bowers, C. Y., F. A. Momany, GA. Reynolds, A. Hong (1984). "On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone." *Endocrinology* **114**(5): 1537-45.
- Bray, G. A. (1990). "Obesity--a state of reduced sympathetic activity and normal or high adrenal activity (the autonomic and adrenal hypothesis revisited)." *Int J Obes* **14 Suppl 3**: 77-91; discussion 91-2.
- Broccardo, M., V. Erspamer, G. Falconieri Erspamer, G. Improta, G. Linari, P. Melchiorri, PC. Montecucchi (1981). "Pharmacological data on dermorphins, a new class of potent opioid peptides from amphibian skin." *Br J Pharmacol* 1981 **73**(3): 625-31.
- Broglio, F., A. Benso, C. Gottero, F. Prodam, C. Gauna, L. Filtri, E. Arvat, AJ. van der Lely, R. Deghenghi, E. Ghigo (2003b). "Non-acylated ghrelin does not possess the pituitary and pancreatic endocrine activity of acylated ghrelin in humans". *J Endocrinol Invest* **26**, 192-196.
- Broglio, F., C. Gottero, E. Arvat, E. Ghigo (2003). "Endocrine and non-endocrine actions of ghrelin." *Horm Res* **59**(3): 109-17.
- Capella, C., E. Solcia, G. Vassallo (1969). "Identification of six types of endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the rabbit." *Arch Histol Jpn* **30**(5): 479-95.
- Carter-Su, C., A. P. King, LS. Argetsiner, LS. Smit, J. Vanderkuur, GS. Campell (1996). "Signalling pathway of GH." *Endocr J* **43 Suppl**: S65-70.
- Castaneda, T.R., J.Tong, R. Datta, M. Culler, MH. Tschöp (2009): " Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism." *Font Neuroendocrinology* **31**, 44-60.
- Castro, M. G. and E. Morrison (1997). "Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain." *Crit Rev Neurobiol* **11**(1): 35-57.
- Cataland, S; SE. Crockett; JC. Brown, EL. Mazzaferri (1974). "Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulation by oral glucose in man." *J Clin.Endocrinol.Metab* ; **39**, 223-228.
- Chamouard, P., A. Klein, E. Martin, M. Adloff, F. Angel (1993). "Regulatory role of enteric kappa opioid receptors in human colonic motility." *Life Sci* **53**(14):1149-56.
- Chan, J. L., J. Bullen, JH. Lee, N. Yiannakouris, CS. Mantzoros (2004). "Ghrelin levels are not regulated by recombinant leptin administration and/or three days of fasting in healthy subjects." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(1): 335-43.
- Chang, L., Y. Ren, X. Liu, WG. Li, J. Yang, B. Geng, NL. Weintraub, C. Tang (2004). "Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart." *J Cardiovasc Pharmacol* **43**(2): 165-70.
- Chang, L., J. Zhao, GZ. Li, B. Geng, CS. Pan, YF. Qi, CS. Tang (2004). "Ghrelin protects myocardium from isoproterenol-induced injury in rats." *Acta Pharmacol Sin* **25**(9): 1131-7.
- Chanoine, J., A. Wong (2004). "Ghrelin gene expression is markedly higher in fetal pancreas compared with fetal stomach: effect of maternal fasting." *Endocrinology* **145**, 3813-3820.
- Chartrel, N., Alvear-Perez, J. Leprince, X. Iturrioz, A. Reaux-Le Goazigo, V. Audinot, Boutin, H. Vaudry, C. Llorens-Cortes (2007). "Comment on "Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake"". *Science* **310**: 996-999.
- Chemelli, R. M., J. T. Willie, CM. Sinton, JK. Elmquist, T. Scammell, C. Lee, JA. Richardson, SC. Williams, Y. Xiong, Y. Kisanuki, TE. Fitch, M. Nakazato, RE. Hammer, CB. Sabar, M. Yanagisawa (1999). "Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation." *Cell* **98**(4): 437-51.

- Chen, C., D. Wu, IJ, Clarke (1996). "Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs." *J Endocrinol* **148**(3): 381-6.
- Chen, H. Y., M. E. Trumbauer, AS. Chen, DT. Weingarth, JS. Adams, EG. Frazier, Z. Shen, DJ. Marsh, SD. Feighner, XM. Guan, Z. Ye, RP. Nargund, RG. Smith, LH. Van der Ploeg, AD. Howard, DJ. MacNeil, S. Qian (2004). "Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein." *Endocrinology* **145**(6): 2607-12.
- Cheng, K., W. W. Chan, A. Barreto, EM. Convey, RG. Smith (1989). "The synergistic effects of His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ on growth hormone (GH)-releasing factor-stimulated GH release and intracellular adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in rat primary pituitary cell culture." *Endocrinology* **124**(6): 2791-8.
- Cheng, K., W. W. Chan, B. Butler, A. Barreto, RG Smith (1991). "Evidence for a role of protein kinase-C in His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂-induced growth hormone release from rat primary pituitary cells." *Endocrinology* **129**(6): 3337-42.
- Cheng, K., W. W. Chan, B. Butler, L. Wei, WR. Schoen, MJ. Wyvratt, MH. Fisher, RG. Smith (1993). "Stimulation of growth hormone release from rat primary pituitary cells by L-692,429, a novel non-peptidyl GH secretagogue." *Endocrinology* **132**(6): 2729-31.
- Clement, K., C. Vaisse, N. Lahlou, S. Cbrol, V. Pelloux, D. Cassuto, M. Gormelen, C. Dina, J. Chambaz, JM. Lacorte, A. Basdevant, P. Bougnères, Y. Lebouc, P. Froguel, B. Guy-Grand (1998). "A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction." *Nature* **392**(6674): 398-401.
- Coelho, JC., N. Senninger, N. Runkel, C. Herfath, K. Messmer (1986). "Effect of analgesic drugs on the electromyographic activity of the gastrointestinal tract and sphincter of Oddi and on biliary pressure." *Ann Surg*; 204: 53-8.
- Cooper, S. J. (1983). "Effects of opiate agonists and antagonists on fluid intake and saccharin choice in the rat." *Neuropharmacology* **22**(3): 323-8.
- Cooper, S.J., T.C.Kirkham, et al. (1993). "Opioid mechanisms in the control of food consumption and taste preferences." *Handbook of experimental pharmacology Opioids II, Vol 104/II* Springer Verlag Berlin,
- Corbett, A. D., M. G. Gillan (1984). "Selectivities of opioid peptide analogues as agonists and antagonists at the delta-receptor." *Br J Pharmacol* **83**(1): 271-9.
- Corbett, A. D., G. Henderson, AT. McKnight, JS. Paterson (2006). "75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail." *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**: S153-62.
- Cowley, M. A., R. G. Smith, S. Diano, M. Tschöp, N. Prochnuk, KL. Grove, CJ. Strasburger, M. Bidlingmaier, M. Esterman, ML. Heiman, LM. Garcia-Segura, EA. Nillni, P. Mendez, MJ. Low, P. Sotonyi, JM. Friedman, H. Liu, S. Pinto, WF. Colmers, RD. Cone, TL. Horvath (2003). "The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis." *Neuron* **37**(4): 649-61.
- Cummings, D. E., R. S. Frayo, C. Marmonier, R. Aubert, D. Chapelot (2004). "Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**(2): E297-304.
- Cumming, D.E., J. Overduin, KE. Foster-Schubert (2004). " Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolutions." *J Clin Endocrinol Metab.* 89:2608-12.
- Cumming, D.E. , J. Overduin (2007). "Gastrointestinal regulation of food intake". *J Clin Invest* 117: 13-23.
- Cummings, D. E., J. Q. Purnell, RS. Frayo, K. Schidova, BE. Wisse, DS. Weigle (2001). "A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans." *Diabetes* **50**(8): 1714-9.
- Cummings, D. E. and M. W. Schwartz (2003). "Genetics and pathophysiology of human obesity." *Annu Rev Med* **54**: 453-71.

- Cuntz, U., E. Fruhauf, R. Wawarta, M. Tschöp, C. Folwaczny, R. Riepl, P. Lehnert, M. Fichter, B. Otto (2002). "A role for the novel weight-regulating hormone ghrelin in anorexia nervosa." Am Clin Lab **21**(4): 22-3.
- Dass, N. B., J. Hill, A. Muir, T. Testa, A. Wise, GJ. Sanger (2003). "The rabbit motilin receptor: molecular characterisation and pharmacology." Br J Pharmacol **140**(5): 948-54.
- Date, Y., M. Kojima, H. Hosoda, A. Sawaguchi, MS. Mondal, T. Suganuma, S. Matsukura, K. Kangawa, M. Nakazato (2000). "Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans." Endocrinology **141**(11): 4255-61.
- Date, Y., N. Murakami, M. Kojima, T. Kuroiwa, S. Matsukura, K. Kangawa, M. Nakazato (2000). "Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats." Biochem Biophys Res Commun **275**(2): 477-80.
- Date, Y., N. Murakami, K. Toshinai, S. Matsukura, A. Nijima, H. Matsuo, K. Kangawa, M. Nakazato (2002). "The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats." Gastroenterology **123**(4): 1120-8.
- Date, Y., M. Nakazato, S. Hasiguchi, K. Dezaki, MS. Mondal, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, T. Arima, H. Matsuo, T. Yada, S. Matsukura (2002). "Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion." Diabetes **51**(1): 124-9.
- Date, Y., M. Nakazato, N. Murakami, M. Kojima, K. Kangawa, S. Matsukura (2001). "Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion." Biochem Biophys Res Commun **280**(3): 904-7.
- Davis, J. C. (1954). "The relation between the pancreatic alpha cells and certain cells in the gastric mucosa." J Pathol Bacteriol **67**(1): 237-40.
- Deghenghi, R. (1997). "The development of 'impervious peptides' as growth hormone secretagogues." Acta Paediatr Suppl **423**: 85-7.
- Delfs, J.M., H. Kong, A. Metsek, Y. Chen, L. Yu, T. Reisine, MF. Chesselet (1994). "Expression of mu opioid receptor mRNA in rat brain: an in situ hybridization study at the single cell level." J Comp Neurol; 345(1):46-68.
- De Luca, A., I.M. Coupar (1996). "Insights into opioid action in the intestinal tract." Pharmacol Ther 69:103-15.
- Del Rincon, J. P., M. O. Thorner, BG. Gaylinn (2001). "Motilin-related peptide and ghrelin: lessons from molecular techniques, peptide chemistry, and receptor biology." Gastroenterology **120**(2): 587-8; author reply 589.
- DelParigi, A., M. Tschop, ML: Heiman, AD. Salbe, B. Vozarova, SM. Sell, JC. Bunt, PA. Tataranni (2002). "High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in prader-willi syndrome." J Clin Endocrinol Metab **87**(12): 5461-4.
- Devi, L. A. (2001). "Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking." Trends Pharmacol Sci **22**(10): 532-7.
- de Zwaan, M. and J. E. Mitchell (1992). "Opiate antagonists and eating behavior in humans: a review." J Clin Pharmacol **32**(12): 1060-72.
- Dezaki, K., H. Hosoda, M. Kakei, S. Hashiguchi, M. Watanabe, K. Kangawa, T. Yada (2004). "Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca²⁺-signalling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents." Diabetes **53**, 3142-3151.
- Dezaki, K., M. Kakei, T. Yada (2007). "Ghrelin uses Galphai2 and activates Kv channels to attenuate glucose induced Ca²⁺-signaling and insulin release in beta-cells: novel signal transduction of ghrelin." Diabetes **56**, 2319-2327.

- Dezaki, K., H. Sone, M. Koizumi, M. Nakata, M. Kakei, H. Nagai, H. Hosoda, K. Kangawa, T. Yada (2006). "Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance." *Diabetes* 55, 3486-3493.
- Dezaki, K., H. Sone, T. Yada (2008). "Ghrelin is a physiological regulator of insulin release in pancreatic islets and glucose homeostasis." *Pharmacology and Therapeutics* 118 239-249
- Dhawan, B.N., F. Cessalini, R. Raghubir, T. Reisine, P.B. Bradley, P.S. Portoghesi, M. Hamon (1996). "International Union of Pharmacology XII. Classification of opioid receptors". *Pharmacol Rev* 48(4): 567-92.
- Dixit, V. D., E. M. Schaffer, R.S. Payle, G.D. Collins, S.K. Sakthivel, R. Palaniappan, J.W. Lillard, D.D. Taub (2004). "Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells." *J Clin Invest* 114(1): 57-66.
- Dores, R., H. Kachaturian, S.J. Watson, H. Akil (1984). "Localization of neurons containing pro-opiomelanocortin-related peptides of the lizard, *Anolis carolinensis*: evidence for region-specific processing of beta endorphin." *Brain Res.* 24:324(2):384-9.
- Dornonville de la Cour, C., M. Bjorkqvist, A.K. Sandvik, I. Bakke, C.M. Zhao, D. Chen, R. Hakanson (2001). "A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control." *Regul Pept* 99(2-3): 141-50.
- Drazen, D.L., T.P. Vahl, D.A. D'Alessio, R.J. Seeley, S.C. Woods (2006). "Effect of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: evidence for a learned response independent of nutrient status." *Endocrinology* 147: 23-30.
- Druce, M. and S. R. Bloom (2003). "Central regulators of food intake." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6(4): 361-7.
- Dupre, J.; Ross, S.A.; D. Watson, J.C. Brown, (1973) "Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man." *J Clin. Endocrinol. Metab.*; 37, 826-828.
- Edholm, T., F. Levin, P.M. Hellström, P.T. Schmidt (2004). "Ghrelin stimulates motility in the small intestine of rats through intrinsic cholinergic neurons." *Regul. Pept.* 121: 25-30.
- Egido, E., M. Rodriguez-Gallardo, R.A. Silvestre, J. Marco (2002). "Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion." *Eur J Endocrinol* 146, 241-244.
- Elmqvist, J. K. (2001). "Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin." *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5: S78-82.
- Enomoto, M., N. Nagaya, M. Uematsu, H. Okumura, E. Nakagawa, F. Ono, H. Hosoda, H. Oya, M. Kojima, K. Kanmatsuse, K. Kangawa, (2003). "Cardiovascular and hormonal effects of subcutaneous administration of ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in healthy humans." *Clin Sci (Lond)* 105(4): 431-5.
- Erdmann, J., F. Lippl, V. Schusdziarra (2003). "Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man." *Regul Pept* 116(1-3): 101-7.
- Esler, W., J. Rudolph, T.H. Claus, W. Tang, N. Barucci, S.E. Brown, W. Bullock, M. Daly, L. Decarr, Y. Li, L. Milardo, D. Molstad, J. Zhu, S.J. Gardell (2007). "Small-molecule ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite and promote weight loss." *Endocrinology* 148, 5175-5185.
- Evans, A., H. Tolonen, H.W. Hense, M. Ferrario, S. Sans, K. Kuulasmaa (2001). "Trends in coronary risk factors in the WHO MONICA Project." *Int Jour Epidemiol* 30: S35-40.
- Fantino, M., J. Hosotte, M. Apfelbaum (1986). "An opioid antagonist, naltrexone, reduces preference for sucrose in humans." *Am J Physiol* 251 R91-96.
- Feighner, S. D., C. P. Tan, K.K. McKee, O.C. Palyha, D.L. Henriuk, S.S. Pong, C.P. Austin, D. Figurosa, D. MacNeil, M.A. Cascieri, R. Nargund, R. Bakshi, M. Abramovitz, R. Stocco, S. Kargman, G. O'Neill, L.H. Van Der Ploeg, J. Evans, A.A. Patchett, R.G. Smith, A.D. Howard (1999). "Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system." *Science* 284(5423): 2184-8.

- Figueroa-Colon, R., N. Tolaymat, SC. Kao (1990). "Gallbladder sludge and lithiasis in an infant born to a morphine user mother." *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 10:234-8.
- Fischli, W., A. Goldstein, MW. Hunkapiller, LE. Hood (1982). "Isolation and amino acid sequence analysis of a 4,000-dalton dynorphin from porcine pituitary." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(17): 5435-7.
- Flier, J. S. (2004). "Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic." *Cell* **116**(2): 337-50.
- Fox-Threlkeld, J. E., H. Manaka, Y. Manaka, S. Cipris, EE. Daniel (1991). "Stimulation of circular muscle motility of the isolated perfused canine ileum: relationship to VIP output." *Peptides* **12**(5): 1039-45.
- Frascarelli, S., S. Ghelardoni, S. Ronca-Testoni, R. Zucchi (2003). "Effect of ghrelin and synthetic growth hormone secretagogues in normal and ischemic rat heart." *Basic Res Cardiol* **98**(6): 401-5.
- Friedman, J. M. (2002). "The function of leptin in nutrition, weight, and physiology." *Nutr Rev* **60**(10 Pt 2): S1-14; discussion S68-84, 85-7.
- Frohman, L. A., R. D. Kineman, J. Kamegai, S. Park, LT. Teixeira, KT. Coschigano, JJ. Kopchic (2000). "Secretagogues and the somatotrope: signaling and proliferation." *Recent Prog Horm Res* **55**: 269-90; discussion 290-1.
- Frühbeck, G., A. Diez-Caballero, MJ. Gil, I. Montero, J. Gomez-Ambrosi, J. Salvador, JA. Cienfuegos (2004). "The decrease in plasma ghrelin concentration following bariatric surgery depends on the functional integrity of the fundus." *Obes Surg*. 14: 606-12.
- Fujii, R., M. Hosoya, S. Fukusumi, Y. Kawamata, Y. Habata, S. Hinuma, H. Onda, O. Nishimura, M. Fujino (2000). "Identification of neuromedin U as the cognate ligand of the orphan G protein-coupled receptor FM-3." *J Biol Chem* **275**(28): 21068-74.
- Fujimiya, M., E. Itoh, N. Kihara, I. Yamamoto, M. Fujimura, A. Inui (2000). "Neuropeptide Y induces fasted pattern of duodenal motility via Y(2) receptors in conscious fed rats." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**(1): G32-8.
- Fujino, K., A. Inui, A. Asakawa, N. Kihara, M. Fujimura, M. Fujimiya (2003). "Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats." *J Physiol* **550**(Pt 1): 227-40.
- Furness, J. B., M. Costa, RJ Miller (1983). "Distribution and projections of nerves with enkephalin-like immunoreactivity in the guinea-pig small intestine." *Neuroscience* **8**(4): 653-64.
- Galligan, J.J., T.F. Burks (1983). "Centrally mediated inhibition of small intestinal transit and motility by morphine in the rat." *J Pharmacol Exp Ther*; 226:356-61.
- Gauna, C., P. J. Delhanty, LJ. Hofland, JA. Janssen, F. Broglio, RJ. Ross, E. Ghigo, AJ. van der Lely (2005). "Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(2): 1055-60.
- Geloneze, B., M. A. Tambascia, VF. Pilla, SR. Geloneze, EM. Repetto, JC. Pareja (2003). "Ghrelin: a gut-brain hormone: effect of gastric bypass surgery." *Obes Surg* **13**(1): 17-22.
- Ghigo, E., E. Arvat, F. Camanni (1998). "Orally active growth hormone secretagogues: state of the art and clinical perspectives." *Ann Med* **30**(2): 159-68.
- Giuliani, S., C. Maggi (1996). "Inhibition of tachykinin release from peripheral nerve endings of sensory nerves by nociceptin, a novel opioid peptide." *Br J Pharmacol* 118:1567-9.
- Glass, M.J., C.J. Billington, AS. Levine (1999). "Opioids and food intake: distributed functional neural pathways?" *Neuropeptides*; 33(5):360-8.
- Glass, M.J., M. Grace, JP. Cleary, CJ. Billington, AS. Levine (1996). "Potency of naloxone's anorectic effect in rats is dependent on diet preference." *Am J Physiol*. 271 R217-R221.

- Gnanapavan, S., B. Kola, SA. Bustin, DG. Morris, P. McGee, P. Fairclough, S. Bhattacharya, R. Carpenter, AB. Grossman, M. Korbonit (2002). "The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans." J Clin Endocrinol Metab **87**(6): 2988.
- Goldstein, A., W. Fischli, et al. (1981). "Porcine pituitary dynorphin: complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(11): 7219-23.
- Goldstein, A., S. Tachibana, LI, Lowney, M. Hunkapiller, L. Hood (1979). "Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(12): 6666-70.,
- Gosnell, B.A., D.D. Krahn, MJ. Majchrzak (1990). "The effects of morphine on diet selection are dependent upon baseline diet preferences." Pharmacol. Biochem Behav; 32:207-12.
- Gourcerol, G., T. Coskun, LS. Craft, JP. Mayer, ML. Heiman, L. Wang, M. Million, DH. St. Pierrem Y. Taché (2007). "Preproghrelin-derived peptide, obestatin, fails to influence food intake in lean or obese rodents." Obesity 25: 2643-2652.
- Granata, R., F. Settani, L. Biancone, L. Trovato, R. Nano, F. Bertuzzi, S. Destefani, M. Annunziata, M. Martinetti, F. Catapano, C. Ghè, J. Isgaard, M. Papotti, E. Ghigo, G. Muccioli (2007). "Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta-cells and human islets: involvement of 3`5`-cyclic adenosine monophosphate /protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidyl inositol 3-Kinase /Akt signaling. Endocrinology 148, 512-529.
- Greenman, Y., N. Golani, S. Gilad, M. Yaron, R. Limor, N. Stern (2004). "Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner." Clin Endocrinol (Oxf) **60**(3): 382-8.
- Grube, D. and W. G. Forssmann (1979). "Morphology and function of the entero-endocrine cells." Horm Metab Res **11**(11): 589-606.
- Gualillo, O., J. Caminos, M. Blanco, T. García-Caballero, M. Kojima, K. Kangawa, C. Dieguez, F. Casanueva (2001). "Ghrelin, a novel placental-derived hormone." Endocrinology **142**(2): 788-94.
- Guan, X. M., H. Yu, OC. Palyha, KK. McKee, SD. Feighner, DJ. Sirinathsinghji, RG. Smith, LH. Van der Ploeg, AD. Howard (1997). "Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues." Brain Res Mol Brain Res **48**(1): 23-9.
- Gutierrez, J., P. Solenberg, DR. Perkins, JA. Willency, MD. Knierman, Z. Jin, DR. Witcher, S. Luo, JE. Onyia, JE. Hale (2008). "Ghrelin octanoylation mediated an orphan lipid transferase." 105: 6320-6325.
- Hackler, L., J. Zadina, LJ. Ge, AJ. Kastin (1997). "Isolation of relatively large amounts of endomorphin-1 and endomorphin-2 from human brain cortex." Peptides 18:1635-1639.
- Hagan, M. M., P. A. Rushing, LM. Pritchard, MW. Schwartz, AM. Strack, LH. Van Der Ploeg, SC. Woods, RJ. Seeley (2000). "Long-term orexigenic effects of AgRP involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **279**(1): R47-52.
- Hammas, B., S.E. Thorn, M. Wattwil (2001). "Propofol and gastric effects of morphine." Acta Anaesthesiol Scand; 45:1023-7.
- Hansen, T. K., R. Dall, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, JS. Christiansen, JO., Jorgensen (2002). "Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity." Clin Endocrinol (Oxf) **56**(2): 203-6.
- Haqq, A. M., I. S. Farooqi, S. O`Rahilly, DD. Stadler, RG. Rosenfeld, KL. Pratt, SH. LaFranchi, JQ. Purnell (2003). "Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome." J Clin Endocrinol Metab **88**(1): 174-8.

- Hashmonai, M., V. L. Go, T. Yaksh, JH. Szurszweski (1987). "Effect of central administration of motilin on migrating complexes in the dog." Am J Physiol **252**(2 Pt 1): G195-9.
- Hashmonai, M. and J. H. Szurszewski (1998). "Effect of cerebroventricular perfusion of bombesin on gastrointestinal myoelectric activity." Am J Physiol **274**(4 Pt 1): G677-86.
- Hataya, Y., T. Akamizu, K. Takaya, N. Kanamoto, H. Ariyasu, M. Saijo, K. Moriyama, A. Shimatsu, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao (2001). "A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans." J Clin Endocrinol Metab **86**(9): 4552.
- Hattori, N., T. Saito, T. Yagyu, BH. Jiang, K. Kitagawa, C. Inagaki (2001). "GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils." J Clin Endocrinol Metab **86**(9): 4284-91.
- Henderson, G. and A. T. McKnight (1997). "The orphan opioid receptor and its endogenous ligand--nociceptin/orphanin FQ." Trends Pharmacol Sci **18**(8): 293-300.
- Hetherington, M. M., N. Vervaet, E. Blass, BJ. Rolls (1991). "Failure of naltrexone to affect the pleasantness or intake of food." Pharmacol Biochem Behav **40**(1): 185-90.
- Hewson, A. K. and S. L. Dickson (2000). "Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats." J Neuroendocrinol **12**(11): 1047-9.
- Holtzman, S. G. (1979). "Suppression of appetitive behavior in the rat by naloxone: lack of effect of prior morphine dependence." Life Sci **24**(3): 219-26.
- Holzer P. (2007). "Treatment of opioid-induced gut dysfunction." Expert Opin Investig Drugs **16**:181-94.
- Hosoda, H., M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa. (2000). "Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue." Biochem Biophys Res Commun **279**(3): 909-13.
- Hosoda, H., M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa (2000). "Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor." J Biol Chem **275**(29): 21995-2000.
- Hosoda, H., M. Kojima, T. Mizushima, S. Shimizu, K. Kangawa (2003). "Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing." J Biol Chem **278**(1): 64-70.
- Hosoya, M., T. Moriya, Y. Kawamata, S. Ohkuba, R. Fujii, H. Matsui, Y. Shintani, S. Fukusumi, Y. Habata, S. Hinuma, H. Onda, O. Nishimura, M. Fujino (2000). "Identification and functional characterization of a novel subtype of neuromedin U receptor." J Biol Chem **275**(38): 29528-32.
- Howard, A. D., S. D. Feighner, DF. Cully, JP. Arena, PA., Liberator, CI. Rosenblum M. Hamelin, DL. Hreniuk, OC. Palyha, J. Anderson, PS. Paress, C. Diaz, M. Chou, KK. Liu, KK. McKee, SS. Pong, LY. Chaung, A. Elbrecht, M. Dashkevicz, R. Heavens, M. Rigby, DJ. Sirinathsinghji, DC. Dean, DG. Melillo, AA. Patchett, R. Nargund, PR. Griffin, JA. DeMartino, SK. Gubpta, JM. Schaeffer, RG. Smith, LH. Van der Ploeg (1996). "A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release." Science **273**(5277): 974-7.
- Howard, A. D., R. Wang, SS: Pong, TN. Mellin, A. Strack, XM. Guan, Z. Zeng, DL. Williams, SD. Feighner, CN. Nunes, B. Murphy, JN. Stair, H. Yu, Q. Jiang, MK. Clements, CP. Tan, KK. McKee, DL. Hreniuk, TP. McDonald, KR. Lynch, JF. Evans, CT. Caskey, LH. Van der Ploeg, Q. Liu (2000). "Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding." Nature **406**(6791): 70-4.

- Hughes, J., T. W. Smith, HW. Kosterlitz, LA. Fothergill, BA. Morgan, HR. Morris (1975). "Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity." *Nature* **258**(5536): 577-80.
- Huszar, D., C. A. Lynch, V. Fairchild-Huntress, JH. Dunmmore, Q. Fang, LR. Berkemeier, W. Gu, RA. Kesterson, BA. Boston, RD. Cone, FJ. Smith, LA, Campfield, P. Burn, F. Lee (1997). "Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice." *Cell* **88**(1): 131-41.
- Hynes, M.A., M. Gallagher, KV. Yacos (1981). "Systemic and intraventricular naloxone administration: effects on water and food intake." *Behav Neural Biol* **32** 334-342.
- Iglesias, M. J., R. Pineiro, M. Blanco, R. Gallego, C. Dieguez, O. Gualillo, JR. Gonzales-Juanatey, F. Lago (2004). "Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes." *Cardiovasc Res* **62**(3): 481-8.
- Ikezaki, A., H. Hodosa, K. Ito, S. Iwama, N. Miura, H. Matsuoka, C. Kondo, M. Kojima, K. Kangawa, S. Sugihara (2002). "Fatin plasma ghelin levels are negatively correlated with insulin resistance and PAI-1, but not with leptin, in obese children and adolescents." *Diabetes* **51**, 3408-3411.
- Inui, A. (2001). "Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach." *Nat Rev Neurosci* **2**(8): 551-60.
- Jiao, Y.Y., S.Y. Guo, T. Umezawa, M. Okada, T. Hisamitsu (2002). "The sympathetic nervous system is involved in the inhibitory effect of morphine on the colon motility in rats." *Auton Neurosci*; **100**:27-31.
- Kachaturian, H., M. Lewis (1985): "Time of origin of opioid peptide-containing neurons in the rat-hypothalamus." *JCompNeurol*. **236**(4):538-46.
- Kageyama, H., H. Funahashi, M. Hirayama, F. Takenoya, T. Kita, S. Kato, J. Sakurai, E.Y. Lee, S. Inoue, Y. Date, M. Nakazato, K. Kangawa, Shioda (2005). "Morphological analysis of ghrelin and its receptor distribution in rat pancreas." *Regul Pept* **126**, 67-71.
- Kaiya, H., M. Kojima, H. Hosoda, A. Koda, K. Yamamoto, Y. Kitajima, M. Matsumoto, Y. Minamitake, S. Kikuyama, K. Kangawa (2001). "Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue." *J Biol Chem* **276**(44): 40441-8.
- Kalra, S. P., M. G. Dube, S. Pu, B. Xu, T.L. Horvath, P.S. Kaira (1999). "Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight." *Endocr Rev* **20**(1): 68-100.
- Kamegai, J., H. Tamura, T. Shimizu, S. Ishii, H. Sugihara, I. Wakabayashi (2001). "Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats." *Diabetes* **50**(11): 2438-43.
- Kanamoto, N., T. Akamizu, T. Tagami, Y. Hataya, K. Moriyama, K. Takaya, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao (2004). "Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene." *Endocrinology* **145**(9): 4144-53.
- Kelley, A.E., B.A. Baldo, W.E. Pratt, M.J. Will (2005). "Cortico-striatal-hypothalamic circuitry and food motivation: Integration of energy, action and reward." *Phys Beh* **86**; 773-95.
- Kelley, A.E., E.P. Bless (1996). Cortico-striatal-hypothalamic circuitry and food motivation: Integration of energy, action and reward." *J Pharmacol Exp Ther*; **278** (3):1499-507.
- Kihara, N., M. Fujimura, I. Yamamoto, E. Itoh, A. Inui, M. Fujimiya (2001). "Effects of central and peripheral urocortin on fed and fasted gastroduodenal motor activity in conscious rats." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**(3): G406-19.
- Kim, M. S., C. Y. Yoon, K.H. Park, C.S. Shin, K.S. Park, S.Y. Kim, B.Y. Cho, H.K. Lee (2003). "Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status." *Neuroreport* **14**(10): 1317-20.

- Kirchner H., J. Gutierrez, P.J. Solenberg, P.T. Pfluger, T.A. Czyzyk, J.A. Willency, A. Schürmann, H.G. Joost, R.J. Jandacek, J.E. Hale, M.L. Heiman, M.H. Tschöp (2009). "GOAT links dietary lipides with the endocrine control of energy balance." *Nature Medicine* 15: 741-745.
- Kirkham, T.C., J.E. Blundell (1984). "Dual action of naloxone and naltrexon on feeding revealed by behavioral analysis: separate effects on initiation and termination of eating." *Appetite*;5:45-52.
- Kojima, M., R. Haruno, M. Nakazato, Y. Date, N. Murakami, R. Hanada, H. Matsuo, K. Kangawa (2000). "Purification and identification of neuromedin U as an endogenous ligand for an orphan receptor GPR66 (FM3)." *Biochem Biophys Res Commun* 276(2): 435-8.
- Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, K. Kangawa (1999). "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." *Nature* 402(6762): 656-60.
- Kojima, M., H. Hosoda, H. Matsuo, K. Kangawa (2000). " Ghrelin and desacyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue." *Biochem Biophys Res Commun*. 279: 909-13.
- Kojima, M., H. Hosoda, K. Kangawa (2001). "Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor." *Horm Res* 56 Suppl 1: 93-7.
- Kojima, M., K. Kangawa (2005). "Ghrelin: Structure and function." *Physiological reviews*: 85 495-222.
- Konturek, P.C, T., Brzozowski, B. Walter, G. Burnat, T. Hess, E.G. Hahn, S.J. Konturek (2006). "Ghrelin-induced gastroprotection against ischemia reperfusion injury involves an activation of sensory afferent nerves and hyperemia mediated by nitric oxide." *Eur J Pharmacol*: 536 (1-2): 171-81.
- Konturek, S. J., J. Pepera, K. Zabielski, P.C. Konturek, T. Pawlik, A. Sziachcic, E.G. Hahn (2003). "Brain-gut axis in pancreatic secretion and appetite control." *J Physiol Pharmacol* 54(3): 293-317.
- Korbonits, M., S. A. Bustin, M. Kojima, S. Jordan, E.F. Adams, D.G. Lowe, K. Kangawa, A.B. Grossmann (2001). "The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors." *J Clin Endocrinol Metab* 86(2): 881-7.
- Korbonits, M., M. Kojima, K. Kangawa, A.B. Grossmann (2001). "Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary." *Endocrine* 14(1): 101-4.
- Koutkia, P., B. Canavan, J. Breu, M.L. Johnson, S.K. Grinspoon (2004). "Nocturnal ghrelin pulsatility and response to growth hormone secretagogues in healthy men." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287(3): E506-12.
- Kromer, W. (1988). "Endogenous and exogenous opioids in the control of gastrointestinal motility and secretion." *Pharmacol Rev* 40(2): 121-62.
- Kromer, W. (1990). "Endogenous opioids, the enteric nervous system and gut motility." *Dig Dis* 8(6): 361-73.
- Krsek, M., M. Rosicka, H. Papezova, J. Krizova, E. Kotrlikova, M. Halusk, V. Justova, Z. Lacinova, Z. Jarkovska (2003). "Plasma ghrelin levels and malnutrition: a comparison of two etiologies." *Eat Weight Disord* 8(3): 207-11.
- Kurz A., D.I. Sessler (2003). " Opioid-induced bowel dysfunction: Pahtophysiology and potetnial new therapies." *Drugs* 63: 649-71.
- Lachowicz, J., Y. Shen, F.J. Monsma, D.R. Sibley (1995). "Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptro family." *J Neurochem* 64:34-40.

- Lapalu, S., C. Moisand, H. Mazarguil, G. Cambois, C. Mollereau, J.C. Meunier (1997). "Comparison of the structure-activity relationships of nociceptin and dynorphin A using chimeric peptides." *FEBS Lett* **417**(3): 333-6.
- Lee, H. M., G. Wang, E.W. Englander, M. Kojima, G.H. Greeley (2002). "Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations." *Endocrinology* **143**(1): 185-90.
- Lehto-Axtelius, D., D. Chen, V.V. Surve, R. Hakanson (2002). "Post-gastrectomy osteopenia in the rat: bone structure is preserved by retaining 10%-30% of the oxyntic gland area." *Scand J Gastroenterol* **37**(4): 437-43.
- Lenard, L. V. Hamai, L. Bartho (1999). "Morphine contracts the guinea pig ileal circular muscle by interfering with a nitric oxide mediated tonic inhibition." *60*:562-6.
- Leonetti, F., G. Silecchia, G. Iacobelis, M.C. Ribaud, A. Zappaterreno, C.V. Iannucci, N. Perrotta, V. Bacci, M.S Basso, N. Basso, U. Di Mario (2003). "Different plasma ghrelin levels after laparoscopic gastric bypass and adjustable gastric banding in morbid obese subjects." *J Clin Endocrinol Metab* **88**(9): 4227-31.
- Levin, F., T. Edholm, P.T. Schmidt, P. Grybäck, H. Jacobsson, M. Degerblad, C. Höybye, J.J. Holst, J.F. Rehfeld, P.M. Hellström, E. Näslund (2006). "Ghrelin stimulates gastric emptying and hunger in normal weight humans." *J.Clin- Endocrinol. Metab.* **91**: 3296-3302.
- Levine, A. S. and C. J. Billington (1989). "Opioids. Are they regulators of feeding?" *Ann N Y Acad Sci* **575**: 209-19; discussion 219-20.
- Lin, L., R. Martin, A.O. Schaffhauser, D.A. York (2001). "Acute changes in the reponse to peripheral leptin with alteration in diet composition." *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **280** R504-509.
- Lin, Y., K. Matsumura, M. Fukuhara, S. Kagiya, K. Fuji, M. Iida (2004). "Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats." *Hypertension* **43**(5): 977-82.
- Lippl, F., F. Kircher (2004). "Effect of GIP, GLP-1, insulin and gastrin on ghrelin release in the isolated rat stomach." *Regul. Pept.* **199**(1-2): 93-8.
- Lippl, F., V. Schusdziarra, H.D. Allescher (2001). "Effect endomorphin on somatostatin secretion in the isolated perfused rat stomach." *Neuropeptides* **35** (5,6), 303-309.
- Lippl, F., V. Schusdziarra, K. Huepogens, H.D. Allescher (2001). "Inhibitory effect of nociceptin on somatostatin secretion of the isolated perfused rat stomach." *Regul Pept.* **107**:37-42.
- Lissett, C. A. and S. M. Shalet (2000). "Effects of growth hormone on bone and muscle." *Growth Horm IGF Res* **10 Suppl B**: S95-101.
- Liu, J., C. Prudom, R. Nass, S.S. Pezzoli, M.C. Oliveri, M.L. Johnson, P. Veldhuis, D.A. Gordon, A.D. Howard, D.R. Witcher, H.M. Geysen, B.D. Gaylinn (2008). "Novel ghrelin assays provide evidence for independent regulation of ghrelin acylation and secretion in healthy young men." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **93**: 1980-1987.
- Lu, S., J. L. Guan, Q.P. Wang, K. Uehara, S. Yamada, N. Goto, Y. Date, M. Nakazato, M. Kojima, K. Kangawa, S. Shioda (2002). "Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus." *Neurosci Lett* **321**(3): 157-60.
- Lundberg, J., B. Hamberger, M. Schultzberg, T. Hökfelt, P.O. Granberg, S. Efendic, L. Terenius, M. Goldstein, R. Luft (1979). "Enkephalin- and somatostatin-like immunactivities in human adrenal medulla and pheochromocytoma". *ProcNatlAcadSciUSA* **76**(8):4079-83.
- Lynch W.C., L. Libby (1983). "Naloxone suppresses intake of highly preferred saccharin solutions in food deprived and sated rats." *Life Sci.* **33** 1909-1914.

- Malik, S., F. MCGlone, D. Bedrossian, A. Dagher (2008). "Ghrelin modulates brain activity in areas that control appetitive behavior" *Cell Metab.* 7: 400-409.
- Manaka, H., Y. Manaka, F. Kostoblanska, J.E. Fox, E.E. Daniel (1989). "Release of VIP and substance P from isolated perfused canine ileum." *Am J Physiol* **257**(2 Pt 1): G182-90.
- Mansour, A., C. A. Fox, H. Akil, S.J. Watson (1995). "Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications." *Trends Neurosci* **18**(1): 22-9.
- Mansour, A., H. Khachaturian, M.E. Lewis, H. Akil, S.J. Watson (1987). "Autoradiographic differentiation of mu, delta and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain." *J Neurosci*;7 (8):2445-64.
- Mansour, A., R. Thompson (1993). "Delta opioid receptor mRNA distribution in the brain: comparison to delta receptor binding and proenkephalin mRNA." *JchemNeuroanat.* 6(6): 351-62.
- Marks-Kaufmann, R., T. Balmagiya, E. Gross (1984). "Modification in food intake and energy metabolism in rats as a function of chronic naltrexone infusions." *Pharmacol Biochem Behav*; 20:911-6.
- Martin, W. R. (1979). "History and development of mixed opioid agonists, partial agonists and antagonists." *Br J Clin Pharmacol* **7 Suppl 3**: 273S-279S.
- Martin-Schild, S., A. Gerall, A.J. Kastin, J.E. Zadina (1999). "Differential distribution of endomorphin-1 and endomorphin-2-like immunoreactives in the CNS of the rodent." *J Comp Neurol* 405:450-471.
- Masuda, Y., T. Tanaka, N. Inomata, N. Ohnuma, S. Tanaka, Z. Itoh, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa (2000). "Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats." *Biochem Biophys Res Commun* **276**(3): 905-8.
- Matsumoto, M., Y. Kitajima, T. Iwanami, Y. Hayashi, S. Tanaka, Y. Minamitake, H. Hosoda, M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa (2001). "Structural similarity of ghrelin derivatives to peptidyl growth hormone secretagogues." *Biochem Biophys Res Commun* **284**(3): 655-9.
- McCloy R.F., J. McCloy (1980). "Autoaddiction: a hypothesis on hunger and Obesity". *Am Heart J*; 100: 933-4.
- McCowen, K. C., J. A. Maykel, B.R. Bistrrian, P.R. Ling (2002). "Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents." *J Endocrinol* **175**(2): R7-11.
- McIntosh, C.H.; R.A. Pederson, H.Koop, J.C. Brown (1981). "Gastric inhibitory polypeptide stimulated secretion of somatostatinlike immunoreactivity from the stomach: inhibition by acetylcholine or vagal stimulation." *Can.J.Physiol Pharmacol.* 1981; **59**, 468-472.
- McKee, K. K., O.C. Palyha, S.D. Feighner, D.L. Hreniuk, C.P. Tan, M.S. Phillips, R.G. Smith, L.H. Van der Ploeg, A.D. Howard (1997). "Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors." *Mol Endocrinol* **11**(4): 415-23.
- Meunier, J. C. (1997). "Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor." *Eur J Pharmacol* **340**(1): 1-15.
- Meunier, J.C., C. Mollereau, L. Toll, C. Suaudeau, C. Moisand, P. Alvinerie, J.L. Butour, J.C. Guillemot, P. Ferrata, B.Monsarrat (1995). "Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL-1 receptor." *Nature* 377:532-5.
- Micic, D., X. Casabiell, O. Gualillo, M. Pombo, C. Dieguez, F.F. Casanueva (1999). "Growth hormone secretagogues: the clinical future." *Horm Res* **51 Suppl 3**: 29-33.
- Milligan, G. (2004). "G protein-coupled receptors: oligomerisation and association with accessory proteins." *Semin Cell Dev Biol* **15**(3): 261.
- Mori, K., A. Yoshimoto, K. Takaya, K. Hosoda, H. Ariyasu, K. Yahata, M. Mukoyama, A. Sugawara, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao (2000). "Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin." *FEBS Lett* **486**(3): 213-6.

- Mori, K., A. Yoshimoto (2005). "Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus", *Regul. Pept.* 126 (2005) 55-59.
- Morita, K. and R.A. North (1981). "Opiates and enkephalin reduce the excitability of neuronal processes." *Neuroscience* 6(10): 1943-51.
- Morita, K. and R.A. North (1982). "Opiate activation of potassium conductance in myenteric neurons: inhibition by calcium ion." *Brain Res* 242(1): 145-50.
- Morley, J.E. and A.S. Levine (1981). "Dynorphin-(1-13) induces spontaneous feeding in rats." *Life Sci* 29(18): 1901-3.
- Morley, J.E. and A.S. Levine (1983). "The central control of appetite." *Lancet* 1(8321): 398-401.
- Morley, J.E., A.S. Levine, G.K. Yim, M.T. Lowy (1983). "Opioid modulation of appetite." *Neurosci Biobehav Rev* 7(2): 281-305.
- Morton, G.J. and M.W. Schwartz (2001). "The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis." *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5: S56-62.
- Mucha, R.F., S.D. Iversen, (1986). "Increased food intake after opioid microinjections into nucleus accumbens and ventral tegmental area of rat." *Brain Res* 397 214-44.
- Muller, E.E., V. Locatelli, D. Cocchi (1999). "Neuroendocrine control of growth hormone secretion." *Physiol Rev* 79(2): 511-607.
- Murakami, N., T. Hayashida, T. Kuroiwa, K. Nakahara, T. Ida, M.S. Mondal, M. Nakazato, M. Kojima, K. Kangawa (2002). "Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats." *J. Endocrinol.* 174: 283-288.
- Murata, M., Y. Okimura, K. Iida, M. Matsumoto, H. Sowa, H. Kaji, M. Kojima, K. Kangawa, K. Chihara (2002). "Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells." *J Biol Chem* 277(7): 5667-74.
- Nagaya, N., M. Kojima, M. Uetmasu, M. Yamagishi, H. Hosoda, H. Oya, Y. Hayashi, K. Kangawa (2001). "Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280(5): R1483-7.
- Nagaya, N., K. Miyatake, M. Uematsu, H. Oya, W. Shimizu, H. Hosoda, M. Kojima, N. Nakanishi, H. Mori, K. Kangawa (2001). "Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure." *J Clin Endocrinol Metab* 86(12): 5854-9.
- Nakazato, M., N. Murakami, Y. Date, M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa, S. Matsukura (2001). "A role for ghrelin in the central regulation of feeding." *Nature* 409(6817): 194-8.
- Neary, N.M., A.P. Goldstone, S.R. Bloom (2004). "Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus." *Clin Endocrinol (Oxf)* 60(2): 153-60.
- Nestler, E.J. and G.K. Aghajanian (1997). "Molecular and cellular basis of addiction." *Science* 278(5335): 58-63.
- Nicholls, R.D. and J.L. Knepper (2001). "Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes." *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2: 153-75.
- Nilsson, G; J. Simon, R.S. Yalow, S.A. Berson (1972) "Plasma gastrin and gastric acid responses to sham feeding in dogs." *Gastroenterology* ; 63, 51-59.
- Nishiwaki H., N. Saitoh (1998). "Inhibitory effect of endomorphin-1 and -2 on acetylcholine release from myenteric plexus of guinea pig ileum." *Jpn J Pharmacol* 78:83-86.
- Noguieras, R., P. Pfluger (2007). "Effects of obestation on energy balance and growth hormone secretion in rodents." *Endocrinology* 148: 21-26.
- Noguieras, R., P. Wiedmer (2007). "The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism" *J Clin Invest* 117: 3475-3488.
- Okumura, H., N. Nagaya, M. Enomoto, E. Nakagawa, H. Oya, K. Kangawa (2002). "Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous peptide from the stomach." *J Cardiovasc Pharmacol* 39(6): 779-83.

- Olszewski, P., M.K. Grace, J.B. Sanders, C.J. Billington, A.S. Levine (2002). "Effect of nociceptin/orphanin FQ on food intake in rats that differ in diet preference." *Pharmacol Biochemistry* 73 529-535.
- Orwell E., J. Kendall (1986). "Betaendorphin and adrenocorticotropin in extrapituitary sites: gastrointestinal tract". *Endocrinology* 107(2) 438-42.
- Osiniski M., P. Bass, E.A. Gaumnitz (1999). "Peripheral and central actions of orphanin FQ (nociceptin) on murine colon." *Am J Physiol* 276:G125-31.
- Otto, B., U. Cuntz, E. Fruehauf, R. Wawarta, C. Foleaczny, R.L. Riepl, M.L. Heimann, P. Lehnert, M. Fichter, M. Tschöp (2001). "Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa." *Eur J Endocrinol* 145(5): 669-73.
- Pang, J.J., R.K. Xu, X.B. Xu, J.M. Cao, C. Ni, W.L. Zhu, K. Asotra, M.C. Chen, C. Chen (2004). "Hexarelin protects rat cardiomyocytes from angiotensin II-induced apoptosis in vitro." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(3): H1063-9.
- Papotti, M., C. Ghe, P. Cassoni, F. Catapano, R. Deghenghi, E. Ghigo, G. Muccioli (2000). "Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues." *J Clin Endocrinol Metab* 85(10): 3803-7.
- Pederson, R.A., H.E. Schubert, J.C. Brown (1975). "Gastric inhibitory polypeptide. Its physiologic release and insulinotropic action in the dog." *Diabetes* ;. 25, 1050-1054.
- Peino, R., R. Baldelli, J. Rodriguez-Garcia, S. Rodriguez-Segade, M. Kojima, K. Kangawa, E. Arvat, E. Ghigo, C. Dieguez, F.F. Casanueva (2000). "Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans." *Eur J Endocrinol* 143(6): R11-4.
- Petersenn, S., A.C. Rasch, M. Penschorn, F.U. Beil, H.M. Schulte (2001). "Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor." *Endocrinology* 142(6): 2649-59.
- Pickel, V.M., K.K. Sumal, S.C. Beckley, R.J. Miller, D.J. Reis (1980). "Immunocytochemical localization of enkephalin in the neostriatum of rat brain: a light and electron microscopic study". *J Comp Neurol*; 189 (4):721-40.
- Poitras, W.J., B. Polvino (2005). "Gastrokinetic effect of ghrelin analog RC-1139 in the rat. Effect on post-operative and on morphine induced ileus." *Peptides*, 26: 1598-1601.
- Pombo, M., C. M. Pombo, A. Garcia, E. Caminos, O. Gualillo, C.V. Alvarez, F.F. Casanueva, C. Dieguez (2001). "Hormonal control of growth hormone secretion." *Horm Res* 55 Suppl 1: 11-6.
- Pomonis, J.D., C.J. Billington, A.S. Levine (1996). "Orphanin FQ, agonist of orphan opioid receptor ORL1, stimulates feeding in rats." *Neuroreport* 8(1): 369-71.
- Popovic, V., D. Micic, S. Damjanovic, M. Djurovic, M. Simic, M. Gligorovic, C. Dieguez, F.F. Casanueva (1996). "Evaluation of pituitary GH reserve with GHRP-6." *J Pediatr Endocrinol Metab* 9 Suppl 3: 289-98.
- Popovic, V., D. Miljic, D. Micic, S. Damjanovic, E. Arvat, E. Ghigo, C. Dieguez, F.F. Casanueva (2003). "Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level." *J Clin Endocrinol Metab* 88(7): 3450-3.
- Porreca F., T.F. Burks (1983). "The spinal cord as a site of opioid effects on gastrointestinal transit in the mouse." *J Pharmacol Exp Ther*; 227:22-7.
- Poykko, S. M., E. Kellokoski, S. Horkko, H. Kauma, Y.A. Kesaniemi, O. Ukkola (2003). "Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes." *Diabetes* 52(10): 2546-53.
- Poykko, S. M., E. Kellokoski, O. Ukkola, H. Kauma, M. Paivansalo, Y.A. Kesaniemi, S. Horkko (2006). "Plasma ghrelin concentrations are positively associated with carotid artery atherosclerosis in males." *J Intern Med* 260(1): 43-52.

- Prado, C.L., A.E. Pugh-Bernard, L. Elghazi, B. Sosa-Pineda, L. Sussel (2004). "Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 2924-9.
- Prentice, A. (2004). "Storing up problems: The medical case for a slimmer nation." Clinical Medicine, 4, 99-101.
- Purnell, J.Q., D.S. Weigle, P. Breen, D.E. Cummings (2003). "Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, and high-density lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans." J Clin Endocrinol Metab **88**(12): 5747-52.
- Qi, X., J. Reed, E.W. Englander, V. Chandrashekar, A. Bartke, G.H. Greeley (2003). "Evidence that growth hormone exerts a feedback effect on stomach ghrelin production and secretion." Exp Biol Med (Maywood) **228**(9): 1028-32.
- Raynor, K., H. Kong, Y. Chen, K. Yasuda, L. Yu, G.I. Bell, T. Reisine (1994). "Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors." Mol Pharmacol **45**(2): 330-4.
- Reid, L. D. (1985). "Endogenous opioid peptides and regulation of drinking and feeding." Am J Clin Nutr **42**(5 Suppl): 1099-132.
- Reimer, M.K., G. Pacini, B. Ahrens (2003). "Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse." Endocrinology **144**(3): 916-21.
- Reinscheid, R. K., J. Higelin, R.A. Henningsen, F.J. Monsma, O. Civelli (1998). "Structures that delineate orphanin FQ and dynorphin A pharmacological selectivities." J Biol Chem **273**(3): 1490-5.
- Reinscheid, R.K., H.P. Nothacker, A. Bourson, A. Ardati, R.A. Henningsen, J.R. Bunzow, D.K. Grandy, H. Langen, F.J. Monsma, O. Civelli (1995). "Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor." Science **270**(5237): 792-4.
- Richter, C.P., L.E. Holt (1938). "Nutritional requirements for normal growth and reproduction in rats studied by the self-selection method." Am J Physiol; 122:734-44.
- Rodgers, R. J., Y. Ishii, J.C. Halford, J.E. Blundell (2002). "Orexins and appetite regulation." Neuropeptides **36**(5): 303-25.
- Rodriguez-Membrilla, A., V. Martinez, P. Vegara (1995). "Peripheral and central cholecystikinin receptors regulate postprandial intestinal motility in the rat." J Pharmacol Exp Ther **275**(1): 486-93.
- Rogers, G.H., H. Frenk, A.N. Taylor, J.C. Liebesking (1978). "Naloxone suppression of food and water intake in deprived rats." Proc West Pharmacol Soc 21 457-460.
- Rosicka, M., M. Krsek, M. Matoulek, Z. Jarkovska, J. Marek, V. Justova, Z. Lacinova (2003). "Serum ghrelin levels in obese patients: the relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels." Physiol Res **52**(1): 61-6.
- Ruter, J., P. Kobelt, J.J. Tebbe, Y. Avsar, R. Veh, L. Wang, B.F. Klapp, B. Wiedemann, Y. Tache, H. Mönnikes (2003). "Intraperitoneal injection of ghrelin induces Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats." Brain Res **991**(1-2): 26-33.
- Sakata, I., K. Nakamura, M. Yamazaki, M. Matsubara, Y. Hayashi, K. Kangawa, T. Sakai (2002). "Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract." Peptides **23**(3): 531-6.
- Sakata, I., M. Yamazaki, K. Inoue, Y. Hayashi, K. Kangawa, T. Sakai (2003). "Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion." Neurosci Lett **342**(3): 183-6.
- Sakurai, T. (2003). "Orexin: a link between energy homeostasis and adaptive behaviour." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **6**(4): 353-60.
- Sakurai, T., A. Amemiya, M. Ishii, I. Matsuzaki, R.M. Chemelli, H. Tanaka, S.C. Williams, J.a: Richardson, G.P. Kozlowki, S. Wilson, J.R. Arch, R.E. Buckingham, A.A. Haynes, S.A.

- Carr, R.S. Annan, D.E. McNulty, W.S. Liu, J.A. Terrett, N.A. Elshourbagy, D.J. Bergsma, M. Yanagisawa (1998). "Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior." Cell **92**(4): 573-85.
- Sanger, D.J., P.S. McCarthy (1980). "Differential effects of morphine on food and water intake in food deprived and freely-feeding rats." Psychopharmacology (Berl.) **72** 103-106.
- Sanger, G.J., B.R. Tuladhar (2004). "The role of endogenous opiates in the control of gastrointestinal motility: predictions from in vitro modelling." Neurogastroenterol Motil **16** (Suppl 2):38-45.
- Sangiao-Alvarellos, S., M.J. Vazquez (2009). "Central ghrelin regulates peripheral lipid metabolism in a growth hormone-independent fashion". Endocrinology **150**: 4562-4574.
- Schmidt, C. J., T. C. Thomas, et al. (1992). "Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions." J Biol Chem **267**(20): 13807-10.
- Schulz, S., M. Schreff (1996). "Nociceptin/orphanin FQ and opioid peptides show overlapping distribution but no co-localization in pain-modulatory brain regions." NeuroReport **7**:3021-5.
- Schusdziarra, V., H. Bender (1983). "Release of bombesin-like immunoreactivity from the isolated perfused rat stomach". Regul Pept. (1) 21:9.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, R.J. Seeley, D.G. Baskin (2000). "Central nervous system control of food intake." Nature **404**(6778): 661-71.
- Shabazian, A., A. Heinemann, H. Schmidhammer, E. Beubler, U. Holzer-Petsche, P. Holzer (2002). "Involvement of mu- and kappa-, but not delta- opioid receptors in the peristaltic motor depression caused by endogenous and exogenous opioids in the guinea pig intestine." Br J Pharmacol; **135**:741-50.
- Shiiba, T., M. Nakazato, M. Mizuta, Y. Date, M.S. Mondal, M. Tanaka, S. Nozoe, H. Hosoda, K. Kangawa, S. Matsuoka (2002). "Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion." J Clin Endocrinol Metab **87**(1): 240-4.
- Shimizu, Y., N. Nagaya, Y. Teranishi, M. Imazu, H. Yamamoto, T. Shokawa, K. Kangawa, N. Kohno, M. Yoshizumi (2003). "Ghrelin improves endothelial dysfunction through growth hormone-independent mechanisms in rats." Biochem Biophys Res Commun **310**(3): 830-5.
- Shintani, M., Y. Ogawa, K. Ebihara, M. Aizawa-Abe, F. Miyanaga, K. Tanaka, T. Hayashi, G. Inoue, K. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao (2001). "Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway." Diabetes **50**(2): 227-32.
- Shuto, Y., T. Shibasaki, K. Wada, I. Parhar, J. Kamegai, H. Sugihara, S. Oikawa, I. Wakabayashi (2001). "Generation of polyclonal antiserum against the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R): evidence that the GHS-R exists in the hypothalamus, pituitary and stomach of rats." Life Sci **68**(9): 991-6.
- Sibringa, N., A. Goldstein (1988). "Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immunsystem". AnnuRevImmunol **6**:219-49.
- Siegel, J. M. (2004). "Hypocretin (orexin): role in normal behavior and neuropathology." Annu Rev Psychol **55**: 125-48.
- Sim, L., R. Xiao (1996). "Identification of opioid receptor-like (orl1) peptide-stimulated (35s)gtp gamma s binding in rat brain." NeuroReport **7**:729-33.
- Small, C.J., S.R. Bloom (2004). "Gut hormones and the control of appetite." Trends Endocrinol Metab **15**(6): 259-63.
- Smith, G. P. (1999). "Introduction to the reviews on peptides and the control of food intake and body weight." Neuropeptides **33**(5): 323-8.

- Smith, R.G., K. Cheng (1993). "A nonpeptidyl growth hormone secretagogue." Science **260**(5114): 1640-3.
- Smith, R. G., S. Feighner, K. Prendergast, X. Guan, A. Howard (1999). "A New Orphan Receptor Involved in Pulsatile Growth Hormone Release." Trends Endocrinol Metab **10**(4): 128-135.
- Smith, R. G., R. Leonard, A.R. Bailey, O. Plyha, S. Feighner, C. Tan, K.K. McKee, S.S. Pong, P. Griffin, A. Howard (2001). "Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands." Endocrine **14**(1): 9-14.
- Smith, R. G., L. H. Van der Ploeg, A.D. Howard, S.D. Feighner, K. Cheng, G.J. Hickey, M.J. Wyvratt, M.H. Fisher, R.P. Nargund, A.A. Patchett (1997). "Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion." Endocr Rev **18**(5): 621-45.
- Solcia, E., C. Capella (1975). "Endocrine cells of the gastric mucosa." Int Rev Cytol **42**: 223-86.
- Soltoft, F., M. Hammer (2009). "The association of body mass index and health-related quality of life in the general population data from the 2003 Health Survey of England". Qual Life Res **18**: 1293-1299.
- Soriano-Guillen, L., V. Barrios, A. Campos-Barros, J. Argente (2004). "Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation." J Pediatr **144**(1): 36-42.
- Sun, Y., P. Wang, H. Zheng, R.G. Smith (2004). "Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4679-84.
- Soltoft, F., M. Hammer (2009). "The association of body mass index and health-related quality of life in the general population data from the 2003 Health Survey of England". Qual Life Res **18**: 1293-1299.
- Standifer, K.M., G.W. Pasternak (1997). "G proteins and opioid receptor-mediated signalling." Cell Signal **9**(3-4): 237-48.
- Steele, P.A., M. Costa (1990). "Opioid-like immunoreactive neurons in secretomotor pathways of the guinea-pig ileum." Neuroscience **38**(3): 771-86.
- Sternini, C. (2001). "Receptors and transmission in the brain-gut axis: potential for novel therapies. III. Mu-opioid receptors in the enteric nervous system." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **281**(1): G8-15.
- Sternini, C., S. Patierno (2004). "The opioid system in the gastrointestinal tract." Neurogastroenterol Motil; **16** (Suppl 2):3-16.
- Stratford, T.R., M.R. Holahan, A.E. Kelley (1997). "Injections of nociceptin into nucleus accumbens shell or ventromedial hypothalamic nucleus increase food intake." Neuroreport **8**(2): 423-6.
- Sweep, C.G., V.M. Wiegant, J. De Vry, J.M. Van Ree (1989). "Beta-endorphin in brain limbic structures as neurochemical correlate of psychic dependence on drugs." Life Sci; **44**(16):1133-40.
- Tachibana, S., K. Araki, S. Ohya, S. Yoshida (1982). "Isolation and structure of dynorphin, an opioid peptide, from porcine duodenum." Nature **295**(5847): 339-40.
- Taha, S.A., H.L. Fields (2005). "Encoding of palatability and appetitive behaviors by distinct neuronal populations in the nucleus accumbens." J Neurosci; **25** (5):1193-202.
- Takaya, K., H. Ariyasu, N. Kanamoto, H. Iwakura, A. Yoshimoto, M. Harada, K. Mori, Y. Komatsu, T. Usui, A. Shimatsu, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao (2000). "Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans." J Clin Endocrinol Metab **85**(12): 4908-11.
- Tanaka, M., Y. Hayashida, T. Iguchi, N. Nakao, N. Nakai, K. Nakashima (2001). "Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon." Endocrinology **142**(8): 3697-700.

- Tanaka, M., T. Naruo, D. Yasuhara, Y. Tatebe, N. Nagai, T. Shiiya, M. Nakazato, S. Matsukura, S. Nozoe (2003). "Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa." Psychoneuroendocrinology **28**(7): 829-35.
- Tang, W.J., A.G. Gilman (1992). "Adenylyl cyclases." Cell **70**(6): 869-72.
- Tannenbaum, G.S., C.Y. Bowers (2001). "Interactions of growth hormone secretagogues and growth hormone-releasing hormone/somatostatin." Endocrine **14**(1): 21-7.
- Taubes, G. (2002). "Cardiovascular disease. Does inflammation cut to the heart of the matter?" Science **296**(5566): 242-5.
- Tena-Sempere, M., M. L. Barreiro, L.C. Gonzalez, F. Gaytan, F.P. Zhang, J.E. Caminos, L. Pinilla, F.F. Casanueva, C. Dieguez, E. Aguilar (2002). "Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis." Endocrinology **143**(2): 717-25.
- Tomasetto, C., S. M. Karam, S. Ribieras, R. Masson, O. Lefebvre, A. Staub, G. Alexander, M.P. Chenard, M.C. Rio (2000). "Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone: the motilin-related peptide." Gastroenterology **119**(2): 395-405.
- Tomasetto, C., C. Wendling, M.C. Rio, P. Poitras (2001). "Identification of cDNA encoding motilin related peptide/ghrelin precursor from dog fundus." Peptides **22**(12): 2055-9.
- Tonini, M., E. Fiori, B. Balestra, V. Spelta, G. D'Agostino, A. Di Nucci, N.C. Brecha, C. Sternini (1998). "Endomorphin-1 and endomorphin-2 activate mu-opioid receptors in myenteric neurons of the guinea-pig small intestine." Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol **358**:686-689.
- Torsello, A., E. Bresciani (2002). "[Ghrelin and GH secretion]." Minerva Endocrinol **27**(4): 257-64.
- Toshinai, K., Y. Date, N. Murakami, M. Shimada, M.S. Mondal, T. Shimbara, J.L. Guan, Q.P. Wang, H. Funahashi, T. Sakurai, S. Shioda, S. Matsukura, K. Kangawa, Nakazato (2003). "Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway." Endocrinology **144**(4): 1506-12.
- Toshinai, K., M. S. Mondal, M. Nakazato, Y. Date, N. Murakami, M. Kojima, K. Kangawa, S. Matsukura (2001). "Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration." Biochem Biophys Res Commun **281**(5): 1220-5.
- Tschop, M., D. L. Smiley, M.L. Heimann (2000). "Ghrelin induces adiposity in rodents." Nature **407**(6806): 908-13.
- Tschop, M., R. Wawarta, R.L. Riepl, S. Friedrich, M. Bidlingmaier, R. Landgraf, C. Folwaczny (2001). "Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels." J Endocrinol Invest **24**(6): RC19-21.
- Tschop, M., C. Weyer, P.A. Tataranni, V. Devanarayan, E. Ravussin, M.L. Heimann (2001). "Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity." Diabetes **50**(4): 707-9.
- Turnberg, L.A. (1983). "Antisecretory activity of opiates in vitro and in vivo in man." Scand J Gastroenterol **84**:79-83.
- Venkova, K., G. Fraser (2007). "Prokinetic effects of a new ghrelin receptor agonist TZIP-101 in a rat model of postoperative ileus" Dig. Dis. Sci. **52** : 2241-2248.
- Vincent, J. P., J. Mazella (1999). "Neurotensin and neurotensin receptors." Trends Pharmacol Sci **20**(7): 302-9.
- Wang, G., H. M. Lee, E. Englander, G.H. Greeley (2002). "Ghrelin--not just another stomach hormone." Regul Pept **105**(2): 75-81.
- Wang, X., L. Liang, L. Du (2007). "The effects of intrauterine undernutrition on pancreas ghrelin and insulin expression in neonate rats." J Endocrinol **194**, 121-129.

- Wang, L., D. H. Saint-Pierre, Y. Tache (2002). "Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus." *Neurosci Lett* **325**(1): 47-51.
- Weihe E., A. McKnight, A.D. Corbett, W. Hartschuh, M. Reinecke, H.W. Kosterlitz (1983). "Characterization of opioid peptides in guinea pig heart and skin." *Life Sci. Suppl* 1:711-14.
- Welch, C.C., E.M. Kim, M.K. Grace, C.J. Billington, A.S. Levine (1996). "Palatability-induced hyperphagia increases hypothalamic dynorphin peptide and mRNA levels." *Brain Res*; 721:126-31
- Wells, T., P. A. Houston (2001). "Skeletal growth acceleration with growth hormone secretagogues in transgenic growth retarded rats: pattern-dependent effects and mechanisms of desensitization." *J Neuroendocrinol* **13**(6): 496-504.
- Wierup, N., H. Svensson, H. Mulder, F. Sundler (2002). "The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas." *Regul Pept* **107**(1-3): 63-9.
- Wierup, N., S. Yang, R.J. McEvelly, H. Mulder, F. Sundler (2004). "Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells." *J Histochem Cytochem* **52**(3): 301-10.
- Wiley, K.E., A.P. Davenport (2002). "Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1." *Br J Pharmacol* **136**(8): 1146-52.
- Williams, J. T., M. J. Christie, O. Manzoni (2001). "Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence." *Physiol Rev* **81**(1): 299-343.
- Williams, D. L., H. J. Grill, D.E. Cummings, J.M. Kaplan (2003). "Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin." *Endocrinology* **144**(12): 5184-7.
- Wong, C.L. (1986). "Central and peripheral inhibitory effects of morphine on intestinal transit in mice." *Meth Find Exp Clin Pharmacol*; 8: 479-83
- Wood, J. D. (1980). "Intracellular study of effects of morphine on electrical activity of myenteric neurons in cat small intestine." *Gastroenterology* **79**(6): 1222-30.
- Wood, J.D., J.J. Galligan (2004). "Function of opioids in the enteric nervous system." *Neurogastroenterol Motl* 16 (Suppl 2):17-28.
- Woods, S. C., R. J. Seeley, D. Porte, M.W. Shwartz (1998). "Signals that regulate food intake and energy homeostasis." *Science* **280**(5368): 1378-83.
- Wortley, K.E., K.D. Anderson, K. Garcia, J.D. Murray, L. Malinova, R. Liu, M. Moncriefe, K. Thabet, H.J. Cox, G.D. Yancopoulos, S.J. Wiegand, M.W. Sleeman (2004). "Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(21): 8227-32.
- Wren, A. M., C.J. Small, H.L. Ward, K.G. Murphy, C.L. Dakin, S. Taheri, A.R. Kennedy, G.H. Roberts, D.G. Morgan, M.A. Ghatei, S.R. Bloom (2000). "The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion" *Endocrinology* 141, 4325-4328
- Wren, A. M., C.J. Small, C.R. Abbott, W.S. Dhillo, L.J. Seal, M.A. Cohen, R.L. Batterham, S. Taheri, S.A. Stanley, M.A. Ghatei, S.R. Bloom (2001). "Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats." *Diabetes* 50, 2540-2547.
- Wren, A. M., L. J. Seal, M.A. Cohen, A.E. Brynes, G.S. Frost, K.G. Murphy, W.S. Dhillo, M.A. Ghatei, S.R. Bloom (2001). "Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(12): 5992.
- Wynne, K., S. Stanley, S. Bloom (2004). "The gut and regulation of body weight." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(6): 2576-82.
- Xia, Y., G.G. Haddad (1991). "Ontogeny and distribution of opioid receptors in the rat brainstem." *Brain Res*; 549(2):181-93.

- Yabuki, A., T. Ojima, M. Kojima, Y. Nishi, H. Mifune, M. Matsumoto, R. Kamimura, T. Masuyama, S. Suzuki (2004). "Characterization and species differences in gastric ghrelin cells from mice, rats and hamsters." *J Anat* **205**(3): 239-46.
- Yang, J., M. Brown, G. Liang, N.V. Grishin, J.L. Goldstein (2008). "Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulation hormone." *Cell* **132**: 387-396.
- Yang, J., T. Zao, J.L. Goldstein, M.S. Brown (2008). "Inhibition of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) bei octanoylated pentapeptides." *PNAS* **105**: 10750-10755.
- Yazdani, A., T. Takahashi, D. Bagnol, S.J. Watson, C. Owyang (1997). "A newly discovered neuropeptide, orphanin FQ; its distribution and action in rat gastrointestinal tract (abstract)." *Gastroenterology* **112**:A12101.
- Yazdani, A., T. Takahashi, D. Bagnol, S.J. Watson, C. Owyang (1999). "Functional significance of a newly discovered neuropeptide, orphanin FQ, in rat gastrointestinal motility." *Gastroenterology* **116**:108-17.
- Yeomans, M.R., P. Wright (1991). "Lower pleasantness of palatable foods in nalmefene-treated human volunteers." *Appetite* **16**: 249-59.
- Yoshimoto, A., K. Mori, A. Sugawara, M. Mukoyama, K. Yahata, T. Suganami, K. Takaya, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao (2002). "Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure." *J Am Soc Nephrol* **13**(11): 2748-52.
- Yuan, C.S., J.F. Foss, M. O'Connor, M.F. Roizen, J. Moss (1998). "Effects of low dose morphine on gastric emptying in healthy volunteers." *J Clin Pharmacol*; **38**:1017-20.
- Yukioka, H., M. Rosen, K.T. Evans, K.G. Leach, M.W. Hayward, G.S. Saggi (1987). "Gastric emptying and small bowel transit times in volunteers after intravenous morphine and nalbuphine." *Anaesthesia*; **42**: 704-10.
- Zadina, J. E., L. Hackler, L.J. Ge, A.J. Kastin (1997). "A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor." *Nature* **386**(6624): 499-502.
- Zamir, N., M. Palkovits, M.J. Brownstein (1983). "Distribution of immunoreactive dynorphin in the central nervous system of the rat." *Brain Res* **280**(1): 81-93.
- Zamir, N., M. Palkovits, M.J. Brownstein (1984). "Distribution of immunoreactive dynorphin B in discrete areas of the rat brain and spinal cord." *Brain Res* **300**(1): 121-7.
- Zhang, J., P. Ren (2005). "Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake." *Science* **310**: 996-999.
- Zhang, W., M. Chen, X. Chen, B.J. Segura, M.W. Mulholland (2001). "Inhibition of pancreatic protein secretion by ghrelin in the rat." *J Physiol* **537**(Pt 1): 231-6.
- Zhang, M., B.A. Gosnell, A.E. Kelley (1998). "Intake of high-fat food is selectively enhanced by mu opioid receptor stimulation within nucleus accumbens." *J Pharmacol Exp Ther*; **285**:908-14
- Zhang, M., A.E. Kelley (2002). "Intake of saccharin, salt and ethanol solutions is increased by infusion of a mu opioid agonist into the nucleus accumbens." *Psychopharmacology (Berl)*; **159** (4):415-23.
- Zhang, W., T. R. Lin, Y. Hu, Y. Fan, L. Zao, E.L. Stuenkel, M.W. Mulholland (2004). "Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus." *J Physiol* **559**(Pt 3): 729-37.
- Zhang, W., L. Zhao, T.R. Lin, B. Chai, Y. Fan, I. Gantz, M.W. Mulholland (2004). "Inhibition of adipogenesis by ghrelin." *Mol Biol Cell* **15**(5): 2484-91.
- Zhu, X., Y. Cao (2006). "On the processing of proghrelin to ghrelin." *Journal of Biological Chemistry* **281**: 38867-38870.

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. V. Schusdziarra danke ich, dass er mir ermöglicht hat die vorliegende Arbeit in seiner Forschungsgruppe durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lippl für die Vergabe des Themas und die Vermittlung der praktischen Fähigkeiten. Er betreute mich während der experimentellen Phase und der Auswertung der Ergebnisse und unterstützte die spätere Ausarbeitung.

Ausserdem bedanke ich mich herzlich bei Frau Herder für die Durchführung der Radioimmunassays.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Forschungspartner Georg Schlierf bedanken, der wesentlich zu allen Bereichen der Arbeit beigetragen hat und über die vielen Hürden hinweggeholfen hat.