

Else-Kröner-Fresenius Zentrum für Ernährungsmedizin
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar

**Bedeutung des Leptins und der Orexine für die Regulation der Ghrelinsekretion
im Magen der Ratte**

Stefanos Atmatzidis

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. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. V. H. Schusdziarra

2. Univ.-Prof Dr. D. Haller

Die Dissertation wurde am 07.04.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 24.09.2008 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	Seite 1
2.	Material und Methoden.....	4
2.1	Versuchstiere.....	4
2.2	Präparationsbeschreibung.....	4
2.3	Versuchsprotokolle.....	7
2.3.1	Vagusstimulation.....	7
2.3.2	Inhibitionsversuche bei gleichzeitiger Vagusstimulation.....	8
2.3.3	Applikation eines Hormons ohne Vagusstimulation.....	10
2.4	Versuchsauswertung.....	11
2.4.1	Bestimmung der Plasmaghrelinkonzentration.....	11
2.4.2	Statistische Auswertung.....	12
3.	Ergebnisse.....	13
3.1	Effekt der Vagusstimulation auf die Ghrelinfreisetzung.....	13
3.2	Effekt des Leptins auf die vagal stimulierte Ghrelinfreisetzung.....	13
3.3	Effekt der Kombination aus Leptin und Insulin auf die vagal stimulierte Ghrelinfreisetzung.....	18
3.4	Effekte der Orexine A und B auf die vagal stimulierte Ghrelinfreisetzung.....	19
3.4.1	Orexin A.....	19
3.4.2	Orexin B.....	20
3.5	Effekt des OX1R-Antagonisten SB-334867 auf die Ghrelinfreisetzung.....	21
3.5.1	Versuche ohne vagale Vorstimulation.....	21
3.5.2	Versuche mit vagaler Vorstimulation.....	22
4.	Diskussion.....	24
4.1	Regulation der Nahrungsaufnahme im ZNS.....	24
4.2	Regulation der Nahrungsaufnahme in der Peripherie.....	25
4.2.1	Mechanische Dehnung des Magens.....	26
4.2.2	Nährstoffe.....	27
4.2.3	Hormone.....	27
4.2.3.1	Ghrelin.....	27
4.2.3.1.1	Entdeckung.....	27
4.2.3.1.2	Struktur.....	28
4.2.3.1.3	Lokalisation.....	29
4.2.3.1.4	Funktion.....	31
4.2.3.1.4.1	Die Rolle des Ghrelins für die Regulation der Nahrungsaufnahme.....	31
4.2.3.1.4.2	Die Wirkung des Ghrelins im ZNS.....	32
4.2.3.1.4.3	Gastrointestinale und pankreatische Effekte des Ghrelins.....	33

4.2.3.1.5	Die Rolle des Ghrelins in pathologischen Zuständen wie Adipositas, Tumorkachexie und Anorexia nervosa.....	33
4.2.3.1.6	Regulation der Ghrelinsekretion.....	36
4.2.3.2	Leptin.....	37
4.2.3.2.1	Entdeckung, Struktur.....	37
4.2.3.2.2	Lokalisation.....	37
4.2.3.2.3	Leptinrezeptor: Struktur und Verteilung.....	38
4.2.3.2.4	Leptin-signaling, Leptinresistenz.....	39
4.2.3.2.5	Die Wirkung des Leptins im ZNS.....	39
4.2.3.2.6	Leptin und Adipositas.....	40
4.2.3.2.7	Regulation der Leptinsekretion.....	41
4.2.3.2.8	Der Einfluss des Leptins auf die Ghrelinsekretion in vivo und in vitro..	42
4.2.3.2.9	Der Einfluss des Insulins und die Kombination aus Insulin und Leptin auf die Ghrelinsekretion in vivo und in vitro.....	44
4.2.3.3	Orexin A und Orexin B.....	45
4.2.3.3.1	Entdeckung.....	45
4.2.3.3.2	Struktur, Lokalisation, Rezeptoren.....	46
4.2.3.3.3	Funktion.....	47
4.2.3.3.3.1	Die Rolle der Orexine bei der Regulation der Nahrungsaufnahme.....	47
4.2.3.3.3.2	Gastrointestinale und pankreatische Effekte der Orexine.....	48
4.2.3.3.4	Orexin-Rezeptor -Antagonisten.....	49
4.2.3.3.4.1	Funktion.....	50
4.2.3.3.5	Der Einfluss der Orexine und des Orexin-Antagonisten SB-334867 auf die Ghrelinsekretion in vivo und in vitro.....	50
4.2.4	Der N. vagus und seine Bedeutung bei der Regulation der Nahrungsaufnahme.....	52
4.2.4.1	Der Einfluss des N. vagus auf die Ghrelinsekretion in vivo und in vitro	53
5.	Zusammenfassung.....	55
6.	Literaturverzeichnis.....	57
7.	Danksagung.....	67

1. Einleitung

Adipositas ist das größte und das am schnellsten wachsende Gesundheitsproblem weltweit. Das beweist die Verdreifachung der Prävalenz in den letzten 20 Jahren, sowohl bei Männern als auch bei Frauen. Zirka 50% der Deutschen sind übergewichtig (BMI > 25 kg/m²), während ca. 20 % adipös sind (BMI > 30 kg/m²). Diese Krankheit schränkt nicht nur die Lebensqualität erheblich ein, sondern ist auch, wegen ihrer Begleiterkrankungen (Typ 2 Diabetes Mellitus, Hypertonie, Schlaganfall, koronare Herzkrankheit, Osteoarthritis u.s.w.), mit erhöhter Morbidität verbunden. Die Kosten für Adipositas-assoziierte Krankheiten in Deutschland werden auf etwa 25 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt, was 6% aller Gesundheitsausgaben in der Bundesrepublik entsprechen würde. In der Geschichte der Menschheit war über Millionen von Jahren die Nahrungsaufnahme zur Deckung des permanent vorliegenden Energieverbrauchs nie garantiert. Deshalb ist die Fähigkeit zur Anlage großer Energiespeicher und ein möglichst sparsamer Verbrauch körpereigener Reserven ein Selektionsvorteil. Die Hälfte der Weltbevölkerung verfügt über ein praktisch unbegrenztes Nahrungsangebot und sieht sich zunehmend mit den Folgen einer Überernährung konfrontiert. Aus den obengenannten Gründen, scheint die Entwicklung von effektiven Behandlungsmethoden, dringender als je zuvor zu sein (113).

Im Rahmen der therapeutisch wichtigen Reduktion des Körpergewichts ist das Verständnis der Regulation der Nahrungsaufnahme von besonderem Interesse. Die ist ein sehr komplexer Vorgang, der durch eine Wechselwirkung von verschiedenen Hormonen und Neuropeptiden, sowohl im ZNS als auch in der Peripherie, geprägt wird.

Die Nahrungsaufnahme führt zu einer Dehnung des Magens, die über vagale Afferenzen zum Hypothalamus vermittelt wird. Innerhalb der verschiedenen Kerngebiete des Hypothalamus, die als übergeordnetes, zentrales Regulationsorgan die verschiedenen Informationen bündeln und integrieren, werden orexigen und anorektisch wirksame Neurotransmitter freigesetzt. Interessanterweise verändert eine bilaterale, afferente Vagotomie im Tierexperiment nicht die Nahrungsaufnahme über einen

Zeitraum von 10 Wochen (113). Das bedeutet, dass beim Wegfall der neuralen Mechanismen offenbar hormonale Faktoren die Regulation übernehmen können. Ein wesentlicher Vertreter dieser Faktoren ist das Hormon Ghrelin. Hierbei handelt es sich um ein orexigenes, aus 28 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon, das überwiegend im Magen produziert wird. Ghrelin wurde 1999 von einer japanischen Forschergruppe entdeckt (75).

Die exogene Applikation von Ghrelin stimuliert den Appetit und die Nahrungsaufnahme bei verschiedenen Spezies einschließlich des Menschen (152). Die Ghrelinplasmaspiegel sind bei Hunger erhöht, fallen unter der Zufuhr von kohlenhydratreichen Mahlzeiten innerhalb von 90 Minuten ab und kehren anschließend auf das Ausgangsniveau zurück (137,25). Weiterhin hemmt die Gabe von Ghrelin-Rezeptor-Antagonisten die Nahrungsaufnahme bei Mäusen (5). Somit scheint Ghrelin an der Hunger- /Sättigungsregulation beteiligt zu sein.

Die Ghrelinsekretion ist darüber hinaus abhängig vom Ernährungszustand des Organismus. Basale Ghrelinplasmaspiegel sind erhöht im Zustand der Malnutrition wie bei Tumorkachexie und Anorexia nervosa (26,66). Bei Adipositas sind die basalen Ghrelinplasmaspiegel dagegen erniedrigt (137). Veränderungen des Körpergewichts sind von inversen Veränderungen des Ghrelinspiegels begleitet (51). Somit scheinen Faktoren, die für die Abstimmung der akuten Nahrungsaufnahme mit der Energiereserve des Organismus zuständig sind, Einfluss auf die Ghrelinsekretion zu nehmen. Derartige Faktoren sollten idealerweise im Fettgewebe ihren Ursprung haben, um eine tonische Rückkoppelung auf die akute postprandiale Kontrolle ausüben zu können. Ein wesentlicher Vertreter dieser Gruppe ist das Hormon Leptin, dessen Plasmaspiegel mit zunehmender Fettzellmasse zunehmen und bei Adipositas meistens erhöht sind (55). Insofern könnte die Adipositas-assoziierte Suppression des Ghrelins auf einen direkten hemmenden Effekt des Leptins zurückzuführen sein, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wird.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird der Einfluß der Orexine auf die Ghrelinsekretion untersucht. Diese orexigenen, Sekretin-ähnlichen Peptide wurden ursprünglich im lateralen Hypothalamus entdeckt (31), in der Folge aber auch im Magen verschiedener Spezies, einschließlich des Menschen (97). Orexin-A besteht aus 33

Aminosäuren, während Orexin-B aus 28 besteht und eine, zu 46% identische Sequenz mit Orexin-A aufweist (79). Die intracerebroventrikuläre Applikation von Orexin-A führt zur Stimulation der Nahrungsaufnahme bei Ratten (58). Bei Hunger und Hypoglykämie wird verstärkt Orexin-A und -B auch aus den endokrinen Zellen des Magenantrums freigesetzt, was in erhöhten Plasmaspiegeln resultiert (79). Dieser präprandiale Anstieg ist ähnlich wie bei Ghrelin. Außerdem weist bei adipösen Individuen der Plasmaspiegel des Orexins-A ähnlich wie der des Ghrelins eine negative Korrelation mit dem BMI auf (1).

Orexine scheinen insofern an der Hunger- /Sättigungsregulation involviert zu sein. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb an dem Wechselspiel zwischen Ghrelin und Orexinen untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Wistarratten mit einem Gewicht von 250 bis 350g verwendet (Charles River Wiga GmbH, Sulzfelden, Deutschland). Sie wurden im Veterinärbereich des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München unter standardisierten Bedingungen gehalten:

- Künstlicher Tag/ Nacht Rhythmus,
- Raumtemperatur 20-23 °C,
- Luftfeuchtigkeit 60-70 %,
- Ernährung mit Alleinfuttermittel für Ratten (Sniff Spezialdiäten GmbH, Guest) und Wasser.

Die Versuchstiere wurden 12 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern gesetzt und in randomisierter Folge den Versuchs- und Kontrollgruppen zugeordnet.

2.2 Präparationsbeschreibung

Ziel der Präparation des isoliert perfundierten Magens war es, über einen, in den Truncus coeliacus implantierten Katheter, selektiv den Magen zu perfundieren und über einen, in die V.portae implantierten Katheter, das Perfusat in vorgeschriebenen Zeiträumen zu sammeln.

Die Ratten wurden nach Kohlenmonoxidinhalation durch eine intraperitoneale Pentobarbitalinjektion narkotisiert (Narcoren[®], 60 mg/kg, Rhone-Merieux, Köln, Deutschland). Je nach Gewicht der Ratte wurden ungefähr 0,06 bis 0,11 ml Narcoren[®]

injiziert. Nach Eintreten der Anästhesie wurden die Versuchstiere in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert.

Die Präparation begann mit dem Eröffnen des Abdomens in der Medianlinie. Nach Darstellung des Magenantrums und des proximalen Duodenums, suchte man den Lobus caudatus der Leber auf und mobilisierte ihn. Anschließend stellte man die Milz dar und entfernte sie unter Schonung der gastroepiploischen Gefäße an der großen Kurvatur. Danach entfernte man das Omentum majus durch sorgfältige Ligatur der Rami epiploici. Als nächstes wurde das Duodenum ca. einen Zentimeter distal des Pylorus durch zwei Ligaturen verschlossen und durchtrennt.

Die Aorta abdominalis wurde vom Truncus coeliacus nach distal bis zum Abgang der Arteria renalis sinistra stumpf freipräpariert und vierfach angeschlungen:

- 1. Anschlingung: proximal des Truncus coeliacus
- 2. und 3. Anschlingung: zwischen dem Truncus coeliacus und dem Abgang der Arteria mesenterica superior
- 4. Anschlingung: unmittelbar proximal des Abgangs der linken Arteria renalis

Die Arteria mesenterica superior wurde an ihrem Abgang ligiert. Danach wurde mit Anschlingung 4 der Blutfluss in der Aorta abdominalis nach distal unterbunden. Nach Ligatur der dorsalen Abgänge, wurde die Aorta kranial des Truncus coeliacus kurzzeitig abgeklemmt, und mit einem Katheter (Silastic-Katheter, Diameter 1,5 mm, Portex-Limited Hythe, England), durch Inzision unmittelbar proximal der Anschlingung 4 kanüliert. Die Katheterspitze wurde unmittelbar distal des Abgangs des Truncus coeliacus platziert und mit Anschlingung 2 und 3 fixiert. Der Katheter wurde mit 2-5 ml heparinierter 0,9% isotonischer Kochsalzlösung (25.000 I.E. Heparin-Natrium/l NaCl) gespült, um eine Thrombosierung zu vermeiden. Dann wurde die Klemme kranial des Truncus coeliacus wieder entfernt, um die Perfusion des Magens während der verbleibenden Präparationszeit zu gewährleisten.

Zur Katheterisierung der Vena portae wurde eine Mesenterialvene inzidiert, ein Katheter (Diameter 1,3 mm, Portex) bis zur Einmündung der Vena gastroepiploica

dextra vorgeschoben und mit zwei Ligaturen fixiert. Um im Folgenden die Ischämiezeit bei der Gastrektomie zu verkürzen, wurden bereits zu diesem Zeitpunkt das Dünndarmkonvolut sowie große Teile des Kolons entfernt.

Ferner wurde der subdiaphragmale Ösophagus möglichst weit oral abgesetzt. Die Aorta abdominalis wurde proximal des Truncus coeliacus ligiert (Anschlingung 1), die Vena portae im Ligamentum hepatoduodenale. Dadurch war der Magen nun weder perfundiert noch oxygeniert. Durch gründliches Spülen des Magens über den Aortenkatheter mit 20 ml heparinisierte, isotoner Kochsalzlösung wurde das Blut aus den Gefäßen entfernt um dadurch eine Thrombosierung zu verhindern.

Schließlich wurde das Präparat mit intakter Gefäßversorgung aus dem Situs entfernt. Danach wurde je ein Katheter durch den Ösophagus (Perfusor-Leitung Typ N, Braun-Melsungen) und das Duodenum (Infusomat- Leitung Typ sec/2, Braun-Melsungen) in das Magenlumen vorgeschoben und fixiert, um den Magen während des Versuchs zu perfundieren und so die Aufrechterhaltung eines konstanten, physiologischen pH Wertes zu erzielen.

Nach Spülung des Magenlumens mit ca. 40 ml Aqua-dist. zur Entfernung von Nahrungsrückständen wurde das Präparat in ein Organbad mit auf 37°C temperiertem Krebs-Ringer-Puffer eingebracht und über eine Rollerpumpe (STA-Schlauchpumpe, Desaga GmbH, Heidelberg, Deutschland) vaskulär und luminal mit einem Flow von 1,5 ml/min kontinuierlich perfundiert. Die vaskuläre Perfusion erfolgte mit einem modifizierten Krebs-Ringer-Puffer bestehend aus 0,9% NaCl, 4,5 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 21,1mM NaHCO₃, 1 ml Glucose 5%/100 ml, 0,2 % Rinderserumalbumin (Serva, Heidelberg, Deutschland) und 4 % Dextran T 70 (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Diese Pufferlösung wurde auf den physiologischen pH-Wert 7,35 eingestellt, mit 95% O₂ und 5% CO₂ gesättigt und auf 37°C warm gehalten. Das vaskuläre Perfusat wurde über den portalen Venenkatheter, mithilfe eines Fraktionssammlers (2212 Helirac, LKB, Bromma), in Reagenzröhrchen (4,5 ml, Greiner-Bio-One), in einminütigen Intervallen gesammelt und nach dem Abschluss des Versuches, bis zur quantitativen Bestimmung von Ghrelin mittels Radioimmunoassay, bei -18°C eingefroren. Luminal wurde der Magen dagegen mit einer auf pH 2 eingestellten physiologischen NaCl-Lösung perfundiert, die ebenfalls auf 37°C erwärmt

war. Dieses Perfusat verließ den Magen über den Duodenalkatheter und wurde verworfen.

Die Operationszeit betrug etwa 30-50 Minuten. Die Ischämiezeit vom Ligieren der Aorta abdominalis bis zum Anschluss des Magens an das Perfusionssystem war maximal 10 Minuten.

2.3 Versuchsprotokolle

Es wurden 3 unterschiedliche Versuchsprotokolle durchgeführt.

2.3.1 Vagusstimulation

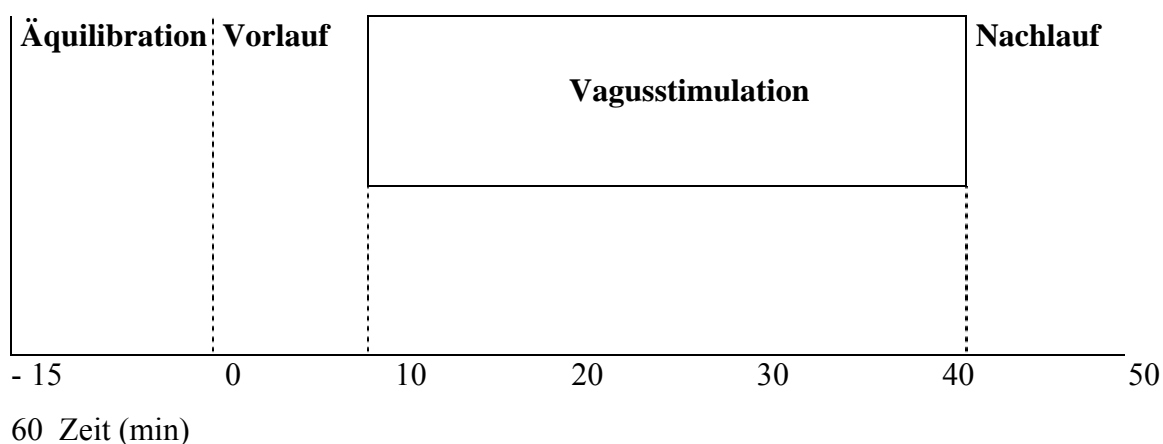
Eine Platinelektrode wurde jeweils am linken und rechten, entlang des Ösophagus verlaufenden und proximal abgetrennten N. vagus befestigt und unter leichten Zug gesetzt, um eine optimale Impulsübertragung zu garantieren. Die Nervi vagi wurden mit einem elektrischen Impulsgeber (S 88 Stimulator, Grass Medical Instruments, W. Warwick, RI USA) monophasisch stimuliert. Als Stimulationsparameter wurden in allen Versuchen eine Spannung von 10 V, eine Impulsdauer von 1 ms und eine Frequenz von 10 Hz verwendet. Diese Frequenz wurde ausgewählt, da sich in Vorarbeiten kein wesentlicher Unterschied bei 2, 5, 10 und 20 Hz zeigte und der Effekt der Stimulation bei 10 Hz über 40 Minuten auf erhöhtem Niveau aufrecht zu erhalten war.

Versuchsablauf:

Jeder Versuch begann mit einer sogenannten Äquilibrationsphase. Diese Phase (Minute -15 bis 0) diente der Stabilisierung der vaskulären und luminalen Perfusion des Magens bei 1,5 ml/min und seiner Erholung aus der kurzen Ischämiezeit. Das Perfusat dieser Phase wurde verworfen. Danach erfolgte die Vorlaufphase (Minute 0 bis 10), bei der

das vaskuläre Perfusat zur Bestimmung des basalen Plasmaghrelinspiegels verwendet wurde. In der Hauptphase des Versuchs (Minute 10 bis 50) erfolgte die Stimulation der N. vagi mit den obengenannten Parametern und die Bestimmung des Ghrelinplasmaspiegel unter Stimulationsbedingungen. Abschließend folgte die Nachlaufphase (Minute 50 bis 60), die der Bestimmung der Ghrelinwerte nach Beendigung der Vagusstimulation diente (Abb.1).

Abb. 1: Versuchsprotokoll Vagusstimulation



2.3.2 Inhibitionsversuche bei gleichzeitiger Vagusstimulation

Diese Versuche wurden zur Aufdeckung inhibitorischer Einflüsse von verschiedenen Hormonen (Leptin, Leptin + Insulin, Orexin-A, Orexin-B und Orexin-Antagonist), bei gleichzeitiger Vagusstimulation, auf die Ghrelinsekretion des Magens *in vitro* durchgeführt. Die Vagusstimulation war notwendig, weil aus früheren Untersuchungen schon bekannt war, dass die Ghrelinsekretionsrate unter nicht stimulierten Bedingungen zu niedrig sein könnte, um relevante Inhibitionseffekte aufzeigen zu können. Aus den bereits erhobenen Ghrelinwerten nach Vagusstimulation

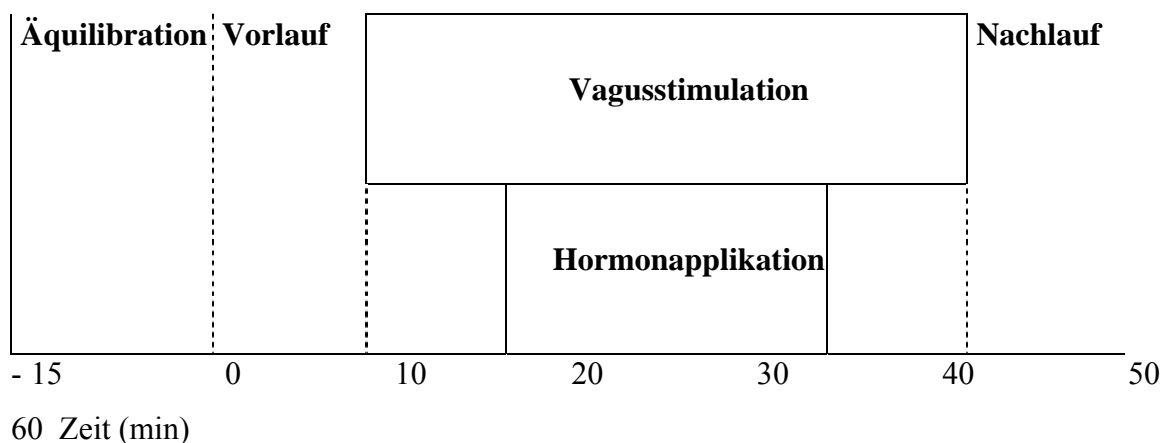
könnte auch die Vitalität des Magens gesichert werden und eine eventuelle Senkung des Ghrelinspiegels nach Hormonapplikation, besser sichtbar gemacht werden.

Für jedes Hormon wurden mehrere Versuche in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt, wobei das jeweilige Hormon immer im Krebs-Ringer-Puffer gelöst wurde.

Versuchsablauf:

Auch diese Versuche begannen mit einer sogenannten Äquilibrationsphase (Minute – 15 bis 0) und einer Vorlaufphase (Minute 0 bis 10). Danach folgte eine 10-minütige reine Vagusstimulation (Minute 10 bis 20). In den nächsten 20 Minuten (Minute 20 bis 40) wurde abgesehen von der Vagusstimulation, die vaskuläre Perfusion des Magens mit einer Mischung aus Krebs-Ringer-Puffer und jeweiliges Hormon modifiziert. In der darauffolgenden Phase (Minute 40 bis 50) wurde die vaskuläre Perfusion, unter Belassen der Vagusstimulation, erneut auf reinem Krebs-Ringer-Puffer umgeschaltet. Das vaskuläre Perfusat der Nachlaufphase (Minute 50 bis 60) diente zuletzt der Bestimmung der Ghrelinwerte nach Abschluss der Vagusstimulation und der Hormonapplikation (Abb. 2).

Abb. 2: Versuchsprotokoll Inhibitionsversuche bei gleichzeitiger Vagusstimulation



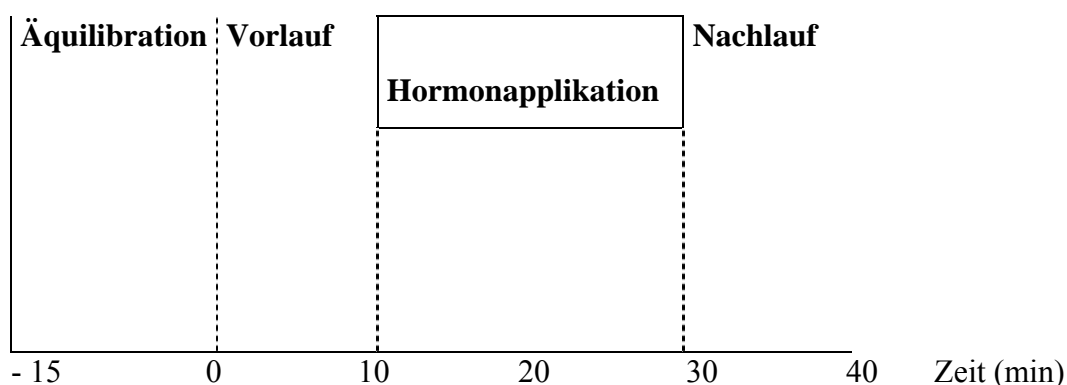
2.3.3 Applikation eines Hormons ohne Vagusstimulation

Bei der letzten Versuchsreihe wurde der Einfluss des OX1R-Antagonisten SB-334867 (1-(2-Methylbenzoxazol-6-yl)-3-[1,5] naphthyridin-4-yl-urea HCl) in verschiedenen Konzentrationen, **ohne** gleichzeitige Vagusstimulation, auf die Ghrelinsekretion des Magens in vitro untersucht.

Versuchsablauf:

Auch diese Versuche begannen mit einer sogenannten Äquilibrationsphase (Minute – 15 bis 0) und einer Vorlaufphase (Minute 0 bis 10). Danach folgte eine 20-minütige (Minute 10 bis 30) modifizierte vaskuläre Perfusion des Magens mit einem Gemisch aus Krebs-Ringer-Puffer und Orexin-Antagonist. In der darauffolgenden Phase (Minute 30 bis 40) wurde die vaskuläre Perfusion erneut auf reinen Krebs-Ringer-Puffer umgeschaltet, um die Ghrelinwerte nach Abschluss der Orexin-Antagonist-Applikation bestimmen zu können (Abb.3).

Abb. 3: Versuchsprotokoll Applikation eines Hormons ohne Vagusstimulation



2.4 Versuchsauswertung

2.4.1 Bestimmung der Plasmaghrelinkonzentration

Die Plasmaghrelinkonzentration wurde mittels einer radioimmunologischen Methode bestimmt. Das Prinzip des kompetitiven Radioimmunoassays besteht darin, dass das zu messende Antigen, in einer Plasmaprobe mit dem radioaktiv markierten Antigen (Tracer) um die Bindungsstellen eines spezifischen Antikörpers, der im Überschuß vorliegt, konkurriert. Da die Ag-Ak-Bindung reversibel ist, stellt sich gemäß gesehen eine Gleichgewichtsreaktion dar, so dass nach einer Inkubationszeit das Verhältnis des gebundenen Tracers zum gebundenen, unmarkierten Antigen dem Verhältnis der Konzentrationen entspricht. Nach der Trennung von freiem und gebundenem Antigen mittels Immunpräzipitation oder Adsorption an Aktivkohle und anschließender Zentrifugation und Dekantierung, kann im Szinti-Gamma-Zähler die Radioaktivität der Probe gemessen werden, die mit der Konzentration des zu bestimmenden Peptids korreliert. Von der Messung verschiedener bekannter Konzentrationen des Peptids in einer Standardverdünnungsreihe kann ein Faktor für die Umrechnung von Gamma-Zählern in Peptidkonzentrationen ermittelt werden.

Es wurde ein im Handel erhältlicher Ghrelin-Radioimmunoassay Kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., California, USA) verwendet. Der verwendete Kit enthielt als Tracer-Lösung mit I^{125} markiertes Ghrelin und als Antiserum anti-humanes Kaninchen-Ghrelin, das laut Hersteller keine Kreuzreaktionen mit Orexin-A, Orexin-B, Orexin-Antagonist, Leptin und Insulin aufweist. Der Variationskoeffizient zwischen den Assays lag bei 10% und der des Intraassays bei 4%. Die Sensitivität des Assays lag bei 10-1280 pg/ml.

2.4.2 Statistische Auswertung

Die Daten aus der radioimmunologischen Bestimmung von Ghrelin wurden EDV-gerecht erfasst und mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) ausgewertet. Die Höhe des gemessenen Ghrelinspiegels wurde als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. Zur weiteren statistischen Analyse wurde das Programm Jandel Sigma- Stat (Erkrath, Germany) verwendet. Alle Daten haben den Normalitätstest bestanden. Zur statistischen Auswertung der Daten innerhalb der Gruppen wurde ein gepaarter t-Test verwendet. Werte mit $p \leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen. Zur graphischen Darstellung wurde das Programm Jandel Sigma-Plot sowie das Programm MS Excel 2000 verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Effekt der Vagusstimulation auf die Ghrelinfreisetzung

Die reine vagale Stimulation mit 10Hz, 10V und einem Intervall von 1ms induzierte einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) der Ghrelinfreisetzung bei allen durchgeführten Versuchen von 315 ± 80 auf ein Maximum von 800 ± 210 pg/min (n=12).

3.2 Effekt des Leptins auf die vagal stimulierte Ghrelinfreisetzung

Die intravaskuläre Applikation von Leptin bewirkte einen signifikanten ($p < 0,05$) Abfall der vagal vorstimulierten Ghrelinfreisetzung bei den Konzentrationen 10^{-12} M, 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M und 10^{-6} M. Nach Beendigung der Leptininfusion stiegen die Ghrelinwerte wieder, ungefähr auf Anfangswerte an. Bei 10^{-14} M wurde allerdings die Grenze der inhibitorischen Wirkung des Leptins erreicht.

In einer Konzentration von 10^{-14} M (n=6) hat Leptin keinen signifikanten Effekt auf die Ghrelinsekretion.(Abb. 1).

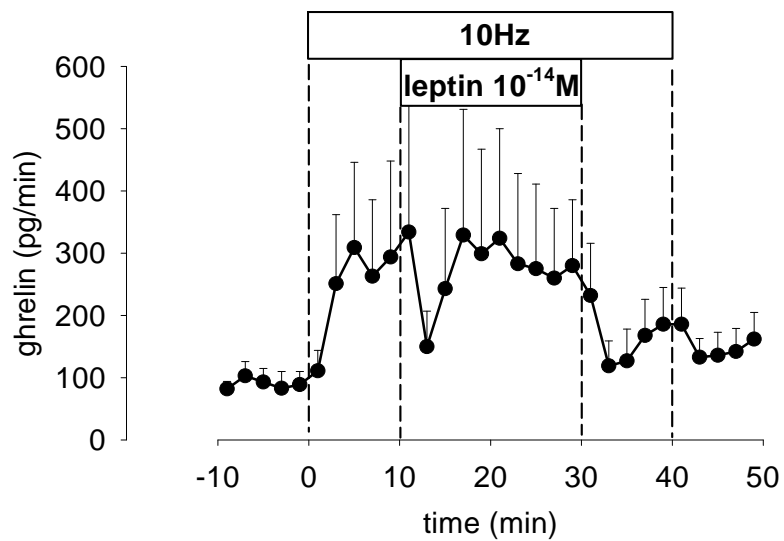


Abb. 1: Effekt der Leptinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-14} M, auf die Ghrelinfreisetzung des vagal vorstimulierten Magens (Mittelwert \pm SEM, n=6).

Schon bei etwas höheren Konzentrationen ist der inhibitorische Effekt des Leptins auf die Ghrelinfreisetzung *in vitro* allerdings eindeutig. So führte die zwanzigminütige Leptinapplikation in einer Konzentration von 10^{-12} M zu einem signifikanten Abfall der Ghrelinsekretion von 615 ± 89 auf ein Minimum von 262 ± 46 pg/min (n=6) (Abb. 2). Ebenso bewirkte Leptin, bei einer Konzentration von 10^{-10} M einen signifikanten Abfall des Ghrelinspiegels von 635 ± 109 auf ein Minimum von 168 ± 49 pg/min (n=5) (Abb. 3).

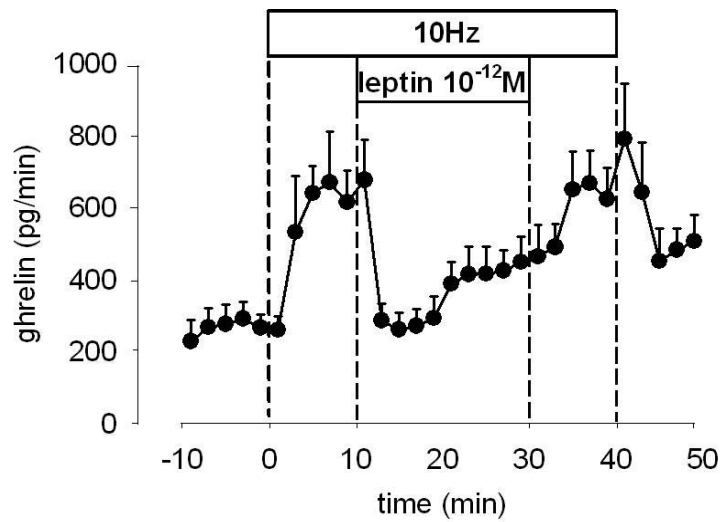


Abb. 2: Effekt der Leptinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-12} M, auf die Ghrelinfreisetzung des vagal vorstimulierten Magens (Mittelwert \pm SEM, n=6).

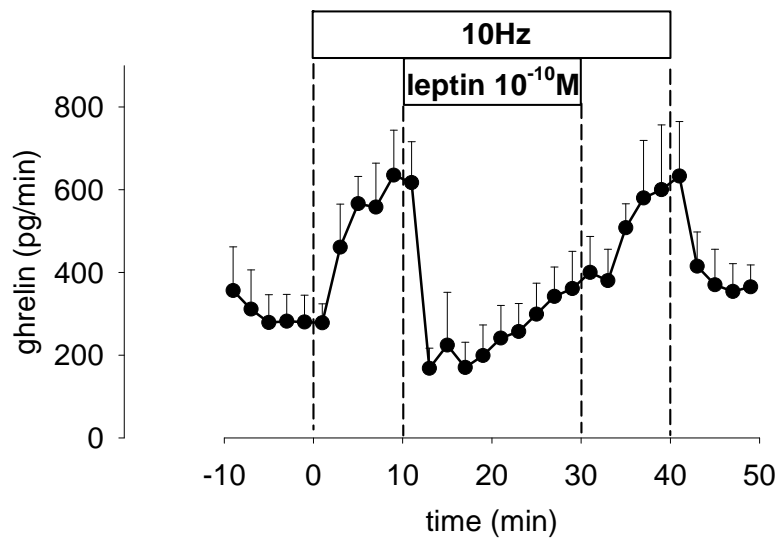


Abb. 3: Effekt der Leptinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-10} M, auf die Ghrelinfreisetzung des vagal vorstimulierten Magens (Mittelwert \pm SEM, n=5).

Bei einer Konzentration von 10^{-9}M bewirkte die Applikation von Leptin einen signifikanten Abfall des Ghrelinspiegels von 463 ± 79 auf ein Minimum von 71 ± 39 pg/min ($n=5$) (Abb. 4) und bei einer Konzentration von 10^{-8}M einen signifikanten Abfall von 581 ± 225 auf ein Minimum von 164 ± 43 pg/min ($n=6$) (Abb.5).

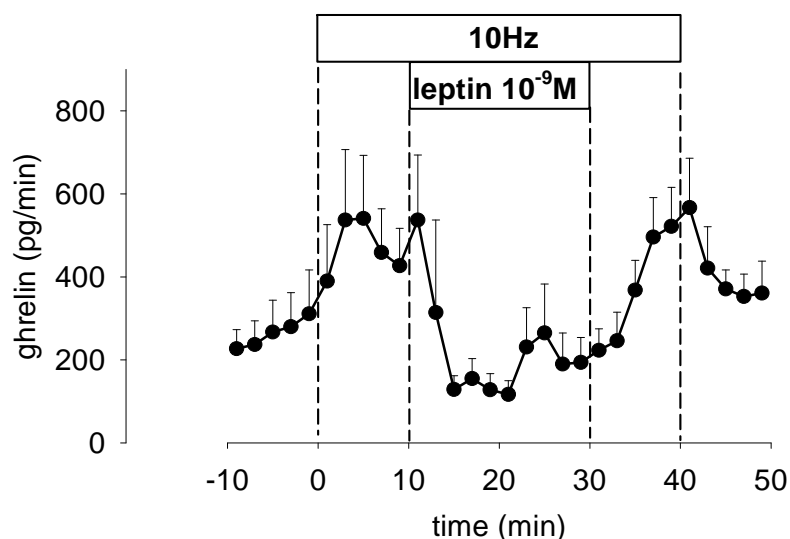


Abb. 4: Effekt der in vitro Leptinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-9}M , auf die Ghrelinfreisetzung des vagal vorstimulierten Magens (Mittelwert \pm SEM, $n=5$).

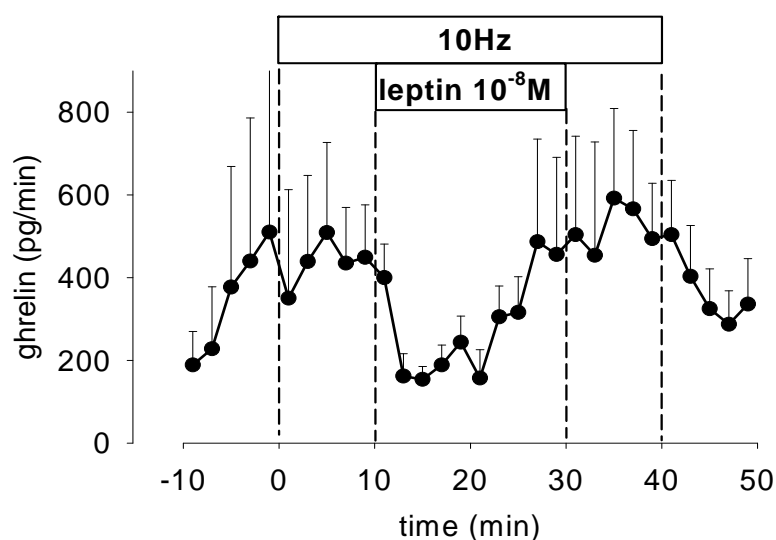


Abb. 5: Effekt der Leptinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-8}M , auf die Ghrelinfreisetzung des vagal vorstimulierten Magens (Mittelwert \pm SEM, $n=6$).

Bei der höchsten, untersuchten Konzentration, 10^{-6} M bewirkte die Leptingabe einen deutlichen, signifikanten Abfall der Ghrelinfreisetzung von 1327 ± 381 auf ein Minimum von 344 ± 71 pg/min ($n=4$) (Abb. 6).

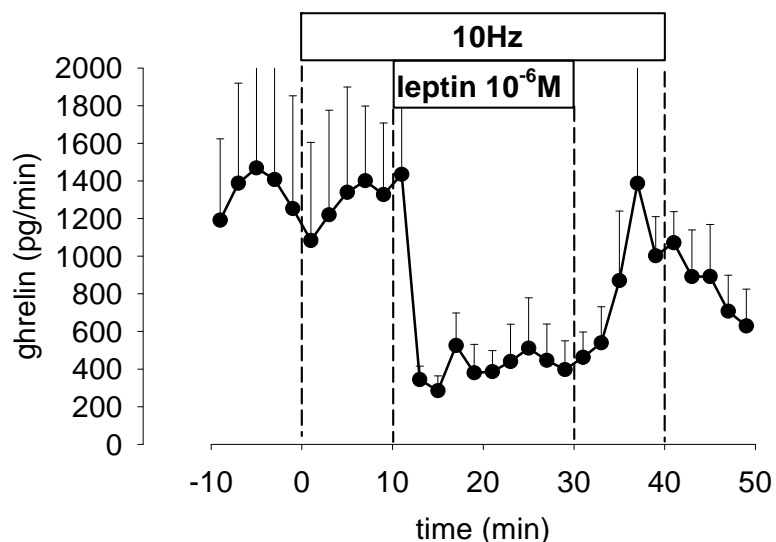


Abb. 6: Effekt der Leptinapplikation bei einer Konzentration von 10^{-6} M, auf die Ghrelinfreisetzung des vagal vorstimulierten Magens (Mittelwert \pm SEM, $n=4$).

Aus der Berechnung des Gesamtghrelinabfalls während der zwanzigminütigen Leptinapplikation resultiert, dass die hemmende Wirkung des Leptins auf die Ghrelinfreisetzung eher bei den Konzentrationen von 10^{-10} M und 10^{-9} M ausgeprägter ist. So war die kumulative Senkung der Ghrelinsekretion des Magens bei einer Leptinkonzentration von 10^{-8} M, -1456 ± 84 pg/20min, bei einer Konzentration von 10^{-9} M, -4473 ± 895 pg/20min, bei einer Konzentration von 10^{-10} M, -4435 ± 1446 pg/min und bei einer Konzentration von 10^{-12} M, -3462 ± 743 pg/20min (Abb. 7).

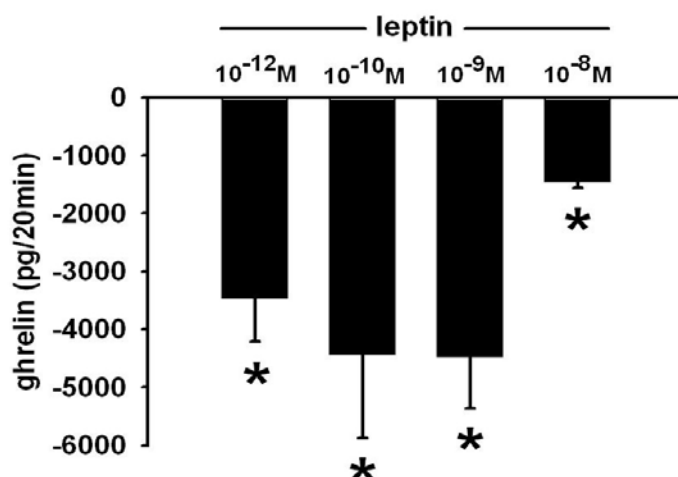


Abb. 7: Kumulative Änderung der vagal vorstimulierten Ghrelinfreisetzung, während der zwanzigminütigen, vaskulären Perfusion des isolierten Rattenmagens mit Leptin, in verschiedenen Konzentrationen (Mittelwert \pm SEM). Die Sternchen weisen auf die Signifikanz der Werte im Vergleich zu den Basalwerten, hin ($p < 0,05$).

3.3 Effekt der Kombination aus Leptin und Insulin auf die vagal stimulierte Ghrelinfreisetzung

Aus vorangegangenen Studien ist bereits bekannt, dass Insulin, selbst bei niedrigen Konzentrationen bis 10^{-10} M , die Ghrelinfreisetzung hemmt. In dieser Versuchsgruppe ($n=6$) wurde untersucht, ob Insulin in einer Konzentration von 10^{-12} M , die für sich unwirksam auf die Ghrelininhibition ist, in Kombination mit Leptin in einer Konzentration von 10^{-14} M zu einer Hemmung der Ghrelinfreisetzung des vagal vorstimulierten Magens führen kann. Es zeigte sich ein sogenannter on/off Effekt, der allerdings nicht signifikant war ($p > 0,05$) (Abb. 8).

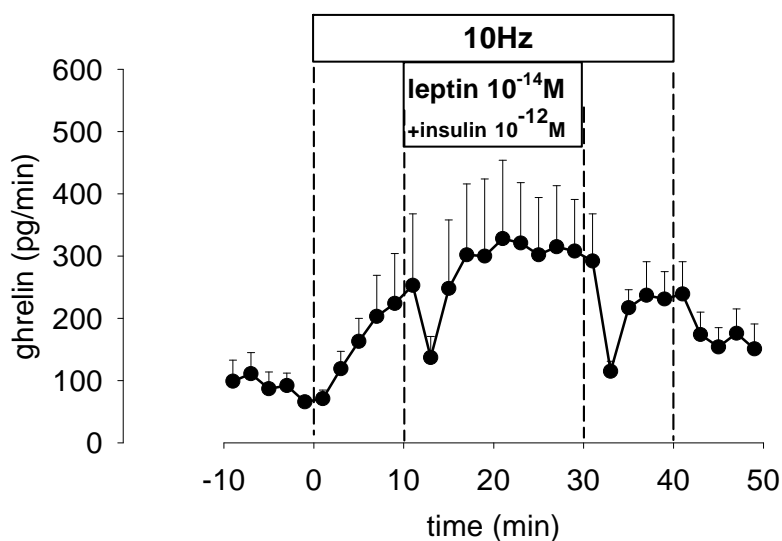


Abb. 8: Effekt der kombinierten, niedrigdosierten Applikation von Leptin und Insulin, auf die vagal vorstimulierte Ghrelinfreisetzung des Magens (Mittelwert \pm SEM, n=6).

3.4 Effekte der Orexine A und B auf die vagal stimulierte Ghrelinfreisetzung

3.4.1 Orexin A

Bei dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss der Applikation von Orexin A in 4 verschiedenen Konzentrationen, auf die vagal vorstimulierte Ghrelinfreisetzung untersucht.

Die zwanzigminütige, vaskuläre Perfusion des Magens mit Orexin A in der niedrigsten, untersuchten Konzentration von 10^{-10} M (n=6) zeigte keinen signifikanten Effekt.

Bei einer Orexin A- Konzentration von 10^{-9} M (n=7) zeigte sich ein Abfall der Ghrelinfreisetzung von 518 ± 106 auf ein Minimum von 305 ± 67 pg/min, der aber auch nicht signifikant war (Abb. 9).

Zuletzt zeigte sich auch bei einer Orexin A-Konzentration von 10^{-8} M (n=5) und 10^{-7} M (n=7) nur ein mäßiger Abfall der Ghrelinfreisetzung von 675 ± 125 auf ein Minimum von 525 ± 130 pg/min, der genauso nicht signifikant war ($p > 0,05$).

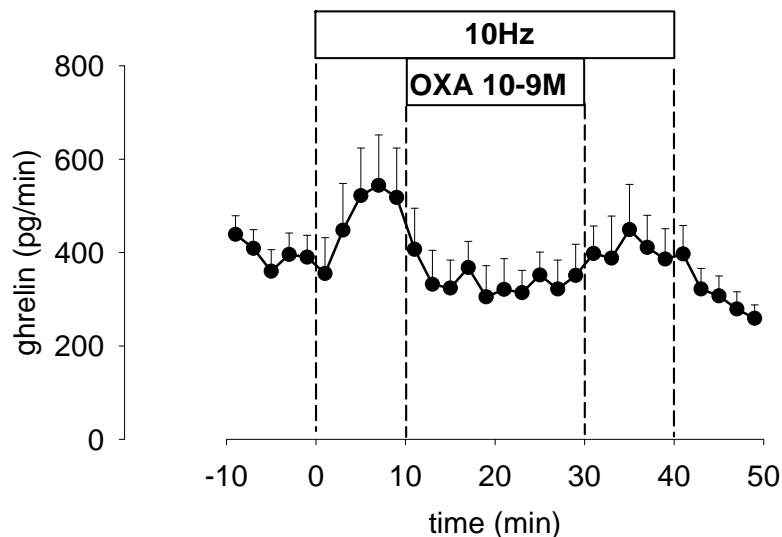


Abb. 9: Effekt der zwanzigminütigen Applikation von Orexin A 10^{-9} M auf die vagal vorstimulierte Ghrelinfreisetzung des isolierten Rattenmagens (Mittelwert \pm SEM, n=7).

3.4.2 Orexin B

Orexin B wurde ebenso im Bezug auf seine Wirkung auf die Ghrelinsekretion des isolierten Magens in zwei verschiedenen Konzentrationen untersucht.

Die Applikation von Orexin B in den Konzentrationen von 10^{-9} M (n=11) (Abb. 10) und 10^{-7} M (n=8) hatte keinen signifikanten Effekt auf die vagal vorstimulierte Ghrelinfreisetzung.

Insgesamt scheinen Orexine, eher eine hemmende Tendenz auf die Ghrelinsekretion des Rattenmagens in vitro zu haben, ohne allerdings sie signifikant zu beeinflussen.

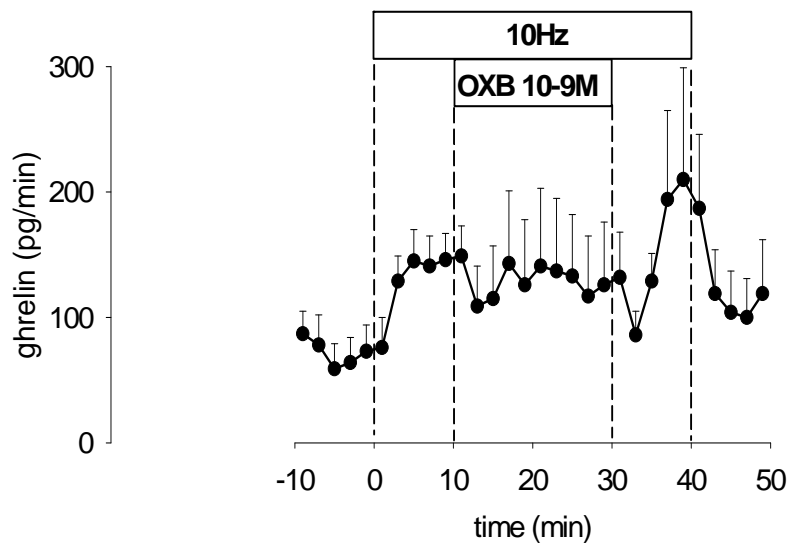


Abb. 10: Effekt der Applikation von Orexin B 10^{-9} M auf die vagal vorstimulierte Ghrelinfreisetzung des isolierten Rattenmagens (Mittelwert \pm SEM, n=8).

3.5 Effekt des OX1R-Antagonisten SB-334867 auf die Ghrelinfreisetzung.

3.5.1 Versuche ohne vagale Vorstimulation

Es wurde der Einfluss der zwanzigminütigen Applikation von OX1R-Antagonist in 2 verschiedenen Konzentrationen, auf die basale Ghrelinfreisetzung des Rattenmagens *in vitro* untersucht.

Die Applikation des OX1R-Antagonisten bei einer Konzentration von 10^{-8} M (n=6) und 10^{-6} M (n=8), (Abb. 11) zeigte keinen signifikanten Effekt auf die basale Ghrelinsekretion.

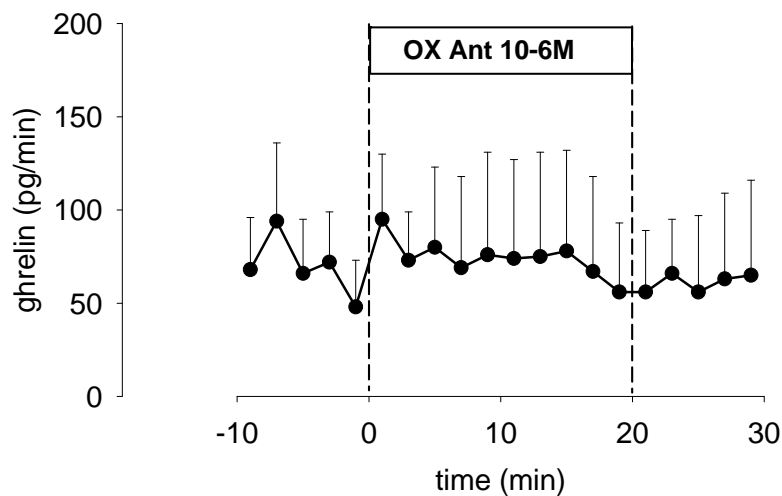


Abb. 11: Effekt der zwanzigminütigen Applikation von OX1R-Antagonist 10^{-6} M auf die basale Ghrelinfreisetzung des Rattenmagens (Mittelwert \pm SEM, n=8).

3.5.2 Versuche **mit** vagaler Vorstimulation

Ein möglicher hemmender Effekt des OX1R-Antagonisten könnte durch die niedrigen basalen Ghrelinspiegel maskiert werden. Es wurde deshalb der Einfluss der Applikation von OX1R-Antagonist in 2 verschiedenen Konzentrationen, auf die vagal vorstimulierte Ghrelinfreisetzung des isolierten Magens untersucht.

Sowohl bei einer Konzentration von 10^{-8} M (n=6) (Abb. 12), als auch bei einer Konzentration von 10^{-6} M (n= 8) (Abb. 13) wurde eine tendentiell stimulierende aber nicht signifikante ($p>0,05$) Wirkung auf die vagal vorstimulierte Ghrelinfreisetzung beobachtet.

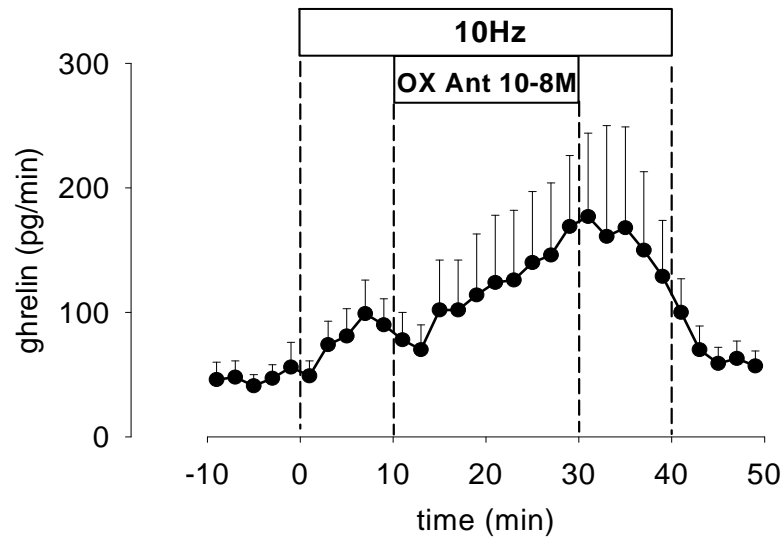


Abb. 12: Effekt der zwanzigminütigen Applikation von Orexin Antagonist 10^{-8} M auf die vagal vorstimulierte Ghrelinfreisetzung des Rattenmagens (Mittelwert \pm SEM, n=6).

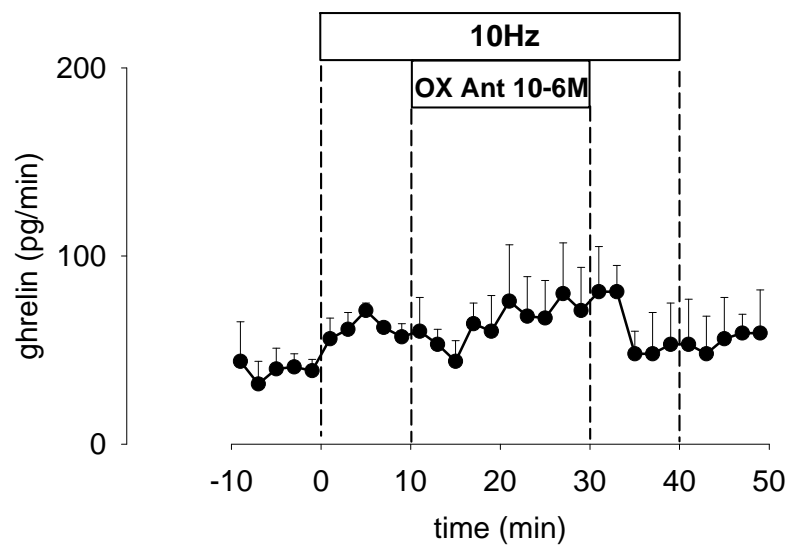


Abb 13: Effekt der zwanzigminütigen Applikation von OX1R- Antagonist 10^{-6} M auf die vagal vorstimulierte Ghrelinfreisetzung des Rattenmagens (Mittelwert \pm SEM, n=8).

4. Diskussion

4.1 Regulation der Nahrungsaufnahme im ZNS

Im ZNS sind zahlreiche Zentren an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt. Die wichtigsten davon sind im Hypothalamus lokalisiert. Dabei handelt es sich um den Nucleus arcuatus (ARC), den paraventricularen Nucleus (PVN), den dorsomedialen Nucleus (DMN), den ventromedialen Nucleus und den lateralen Hypothalamus. Insbesondere der Nucleus arcuatus, der an der Basis des Hypothalamus auf jeder Seite des 3. Ventrikels lokalisiert ist und sich rostrokaudal von der hinteren Grenze des Chiasma opticum bis zu den Corpora mamillaria erstreckt, stellt eine wichtige Verbindung zur peripheren Signaltransduktion dar, da hier die Blut-Hirn-Schranke fehlt (69). Sämtliche hypothalamischen Kerngebiete haben ausgedehnte neurale Verbindungen untereinander und zu verschiedenen extrahypothalamischen Arealen, wie den Nucleus tractus solitarii (NTS) oder der Area postrema im Hirnstamm, dem Tractus retinohypothalamicus, dem Bulbus olfactorius und dem limbischen System und nicht zuletzt auch dem Kortex. Diese neuronalen Verbindungen dienen der Interaktion zwischen den, im Hypothalamus freigesetzten anorektischen und orexigenen Neurotransmittern und den, aus der Peripherie stammenden Sättigungssignalen und sind auch die anatomische Basis für die funktionell sehr bedeutende Modifikation des Essverhaltens durch sensorische (Geschmack, Geruch, Anblick) und kognitive (Gewohnheiten, soziales Lernverhalten und Stressoren) Mechanismen (69).

Von besonderer Bedeutung für die zentrale Regulation der Nahrungsaufnahme scheinen auch extrahypothalamische Zentren in der Medulla Oblongata (Nucleus tractus solitarius und Nucleus dorsalis des N. Vagus) zu sein. Diese Kerngebiete dienen der Verarbeitung der, aus der Peripherie stammenden Sättigungssignale und erhalten zahlreiche viszeroafferente Fasern aus dem oberen gastrointestinalen Trakt (GIT), die mit dem N. facialis, dem N. glossopharyngeus und dem N. vagus verlaufen (22).

Stimulation des ventromedialen Nucleus von Tieren führt zur Verminderung der Nahrungsaufnahme, während seine Schädigung Hyperphagie und Adipositas hervorruft

(„Sättigungszentrum“). Dagegen, hat eine Stimulation oder Schädigung des lateralen Hypothalamus gegenteilige Ergebnisse („Hungerzentrum“) (59). Diese Beobachtung wurde zum ersten mal 1940 von Hetherington et al. gemacht. Seitdem und vor allem in den letzten 10 Jahren, wurden zahlreiche neue Entdeckungen gemacht, die verschiedene biologische Signale und Interaktionen, im Rahmen der Regulation der Nahrungsaufnahme im ZNS zum Vorschein brachten. So kam es auch zur Identifikation von mehreren appetithemmenden (Dopamin, Serotonin, Noradrenalin, Cholezystokinin [CCK], cocaine- and amphetamine-regulated transcript [CART], glucagon-like peptide 1 [GLP-1], α -melanocyte stimulating hormone [α -MSH] u.s.w.) und appetitstimulierenden (Neuropeptid Y [NPY], agouti-related protein [AgRP], Gamma-amino-Buttersäure [GABA], melanin-concentrating hormone [MCH], Endogene Opioid- Peptide [β -Endorphin, Dynorphin, Enkephalin], Ghrelin, Galanin, Orexin A und B u.s.w.) Neurotransmittern, die innerhalb der relevanten Hirnregionen nachweisbar sind und einen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme nach exogener Applikation haben (69). Die funktionelle Bedeutung dieser Neurotransmitter kann man daran ermessen, dass durch Rezeptorblocker zwar akut Änderungen des Essverhaltens nachweisbar sind, dass aber ein chronischer Mangel eines bestimmten Neurotransmitters sowohl auf der anorektischen, wie auch auf der orexigenen Seite nicht von nennenswerten Veränderungen des Körpergewichts begleitet ist. Das deutet darauf hin, dass der Ausfall einzelner Neurotransmitter sehr leicht durch andere Faktoren kompensiert werden kann.

4.2 Regulation der Nahrungsaufnahme in der Peripherie

Eine Vielfalt von peripheren Signalen sind an der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energiehaushalts beteiligt.

Beim Menschen, wie bei zahlreichen anderen Spezies auch, liegt der Ursprung der Sättigungssignale im Gastrointestinaltrakt. Dies ist sinnvoll, da nur so eine schnelle und unkomplizierte Modifikation der Nahrungsaufnahme in Abhängigkeit von den sehr variablen Mengen und der Zusammensetzung der Nahrung erfolgen kann und vor allem

auch eine Abstimmung mit den Verdauungs- und Resorptionsmechanismen gewährleistet ist. Zu den Sättigungssignalen zählen: a) die mechanische Dehnung des Magens b) die verschiedenen Makronährstoffe (Kohlenhydrate, Fett und Eiweiß) und c) mehrere Hormone aus dem Gastrointestinaltrakt (CCK, GLP-1, Peptid YY u.s.w.) (149,55). Es muß allerdings betont werden, dass diese Hormone meistens nur in pharmakologischen und nicht in physiologischen Dosierungen in der Lage sind, die Nahrungsaufnahme zu hemmen. Außerdem die Tatsache, dass bei Patienten nach Gastrektomie das Hunger- und Sättigungsgefühl total verschwunden ist, deutet darauf hin, dass bei den meisten Spezies eher gastrale und nicht intestinale Regulationsmechanismen für die Sättigung zuständig sind (113). Die bilaterale, afferente Vagotomie im Tierexperiment hemmt nicht die Nahrungsaufnahme über einen Zeitraum von 10 Wochen (113). Das lässt vermuten, dass abgesehen von der mechanischen Dehnung des Magens auch einige gastrale, hormonale Faktoren die Sättigung beeinflussen könnten. Zwei Kandidaten dieser Gruppe könnten das neuerdings entdeckte Hormon Ghrelin und die Orexine sein.

Ein zweites peripheres Regulationssystem ist erforderlich, um die akute Nahrungsaufnahme mit der Energiereserve des Organismus abstimmen zu können um so das Körpergewicht konstant zu halten. Derartige Faktoren sollten idealerweise im Fettgewebe ihren Ursprung haben, um eine tonische Rückkoppelung auf die akute postprandiale Kontrolle ausüben zu können. Diese Faktoren werden 1. proportional zur Körperfettmenge sezerniert, können 2. die Sensitivität gegenüber den Sättigungssignalen ändern und haben 3. Zugang zu speziellen Arealen des ZNS. Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist das Hormon Leptin (150,9).

4.2.1 Mechanische Dehnung des Magens

Der wesentliche Mechanismus, der zur Aktivierung von Sättigungssignalen führt, ist die Füllung und Dehnung des Magens. Dabei werden sogenannte Mechano- und Dehnungsrezeptoren aktiviert und mit Hilfe der vagalen Afferenzen werden dann entsprechende Sättigungssignale zum ZNS weitergeleitet. Geliebter et al. zeigten als

erste, dass die Ballondilatation des Magens der Menschen mit einem Volumen von 400 ml zur Reduktion der Nahrungsaufnahme führt (45). Ähnliche Ergebnisse hatte auch eine Studie, bei der die Dehnung des Magens mit hochviskösen Guar/Mannitol Lösungen hervorgerufen wurde (113).

4.2.2 Nährstoffe

Die Makronährstoffe Fett, Eiweiß und Kohlenhydrate sind in zahlreichen Untersuchungen hinsichtlich ihres Einflusses auf Sättigung, Energieaufnahme und Ausmaß und Dauer des Hunger-/Sättigungsgefühls verglichen worden. Sowohl der Vergleich von fett- und kohlenhydratreichen als auch von eiweiß- und kohlenhydratreichen Mahlzeiten ergab eine identische Nahrungsaufnahme und Hunger-/Sättigungsgefühl in mehreren Langzeitstudien. Daraus resultiert, dass die drei Makronährstoffe keinen nährstoffspezifischen Einfluss auf die Sättigung ausüben. Somit scheint das Auftreten der Sättigung eher von der Energiedichte als von der Zusammensetzung der Mahlzeiten abhängig zu sein (142,126,85).

4.2.3 Hormone

4.2.3.1 Ghrelin

4.2.3.1.1 Entdeckung

1980 versuchte die Gruppe von Bowers zum ersten mal neue Substanzen zu entwickeln, die die Sekretion von GH (Growth hormone) stimulieren. Damals war bereits bekannt, dass Enkephaline, die Freisetzung von GH auf hypothalamischer Ebene, aber nicht auf hypophysärer Ebene fördern können. Bowers et al. schafften es, durch chemische Modifikation der Met-Enkephalin-Struktur ein, in vitro und in vivo, sehr

potentes GH-releasing Hexapeptid zu entwickeln, das GHRP-6 genannt wurde (15). GHRP-6 war die Basis für die Entstehung von anderen synthetischen GH-Sekretagoga (GHS), wie Hexarelin und MK-0677, die im Vergleich zu GHRP-6 eine bessere Bioverfügbarkeit und eine längere Halbwertszeit aufweisen (20). Die endgültige Isolierung des Hormons GHRH im Jahr 1982 führte zu einem vorübergehenden Stillstand der Forschung im Gebiet der GHS. Erst ein paar Jahre später wurde beobachtet, dass die GHS synergistisch mit GHRH wirken und deswegen ihre Wirkung durch einen getrennten Mechanismus, mit Hilfe von speziellen Rezeptoren entfalten müssen (10). Diese Kenntnis führte zu der Klonierung des GHS –Rezeptors, des ersten „orphan“ –Rezeptors, der mithilfe von synthetischen Komponenten (GHS) isoliert wurde (65). Der GHS-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der von einem einzigen Gen auf der chromosomalen Lokalisation 3q26.2 exprimiert wird (89). Bis zum heutigen Tag wurden 2 Subtypen dieser Rezeptoren identifiziert, nämlich der GHSR1a und der GHSR1b (122). 1999 isolierten Kojima et al. aus dem Magen der Ratten den endogenen Liganden dieses Rezeptors, ein Peptid, das Ghrelin genannt wurde, in Anlehnung an die indogermanische Wurzel „ghre“ des englischen Verbs „grow“ und dem in der endokrinologischen Nomenklatur üblichen Suffix „-relin“ für Hormone, die stimulierend auf die Freisetzung eines anderen Hormons wirken (75).

4.2.3.1.2 Struktur

Ghrelin ist ein Peptid, das aus 28 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 3315 aufweist. Das humane Ghrelin-Gen ist lokalisiert auf dem Chromosom 3p26-p25 und besteht aus 4 exons und 3 introns, wie auch das Gen der Ratten und Mäuse (144). Die verschiedenen Spleißvorgänge der Ghrelin- prä-m-RNA führen zu der Besonderheit, dass aus dem selben Ghrelin-Gen zwei verschiedene Moleküle, nämlich Ghrelin und Des-Gln 14-Ghrelin entstehen können. Des-Gln14-Ghrelin unterscheidet sich von dem normalen Ghrelin insofern, dass an der Position 14 die Aminosäure Glutamin fehlt. Beide Peptide unterliegen vor ihrer Sekretion einem enzymatischen

Prozess im Zytoplasma, es wird nämlich die Hydroxylgruppe der Aminosäure Serin an der Position 3 acetyliert (20). Ghrelin ist das einzige, bis jetzt bekannte Hormon, das vor seiner Sekretion einer Acetylierung unterliegt. Diese Acetylierung ist für die Bindung an dem GHSR1a und die biologische Aktivität des Moleküls notwendig. 80% des zirkulierenden Ghrelins ist allerdings nicht acetyliert. Es wird vermutet, dass auch diese Form des Ghrelins biologisch aktiv sein kann und einige kardiovaskuläre und anti-proliferative Effekte durch Bindung an andere Subtypen des GHS-Rezeptors entfalten kann (64).

Das menschliche Ghrelin unterscheidet sich von dem der Ratten in nur 2 Aminosäuren. Außerdem ist es zu 36% strukturell identisch mit Motilin. Sowohl Ghrelin als auch Motilin stimulieren die Nahrungsaufnahme und die GH-Sekretion und werden beide in enterochromaffinen Zellen produziert. Allerdings bindet Motilin nicht an den GHSR1a. Trotzdem könnten beide Peptide durch einem ähnlichen Prozess entstanden sein (6,75,95).

4.2.3.1.3 Lokalisation

Ghrelin wird im ganzen Gastrointestinaltrakt produziert, hauptsächlich aber im Fundus des Magens mit absteigender Häufigkeit nach distal (75). Verantwortlich für seine Produktion sind die sogenannten X/A-like-Zellen, ein endokriner Zelltyp, der in den Säure-produzierenden Drüsen des Magens identifiziert wurde und 20-25% aller endokriner Zellen des Magens repräsentiert. Diese Zellen synthetisieren runde, elektronendichte Granula, die das Ghrelin beinhalten. Außerdem haben sie keinen Kontakt mit dem Lumen der Drüsen, reagieren hauptsächlich auf physikalische und chemische Reize, die aus der basolateralen Seite stammen und sind in der Nähe von Kapillaren lokalisiert (sogenannte close-type cells). Das deutet darauf hin, dass die Ghrelinsekretion hauptsächlich direkt ins Plasma und nicht in den Gastrointestinaltrakt stattfindet (27).

Eine Gastrektomie reduziert den zirkulierenden Ghrelinspiegel zu nur 80% (27). Das lässt vermuten, dass abgesehen von dem Magen, auch in anderen Organen wie Darm, Pankreas, Niere, Hypothalamus, Lymphozyten und Plazenta eine Ghrelinproduktion vorhanden ist, jedoch in bedeutend kleineren Mengen als im Magen (46). In sehr kleinen Mengen wurde Ghrelin auch im Ösophagus, in der Gallenblase, in der Leber, in der Milz, in der Haut und in den Adipozyten identifiziert (68). Die Rolle des extragastointestinal-produzierten Ghrelins ist noch unklar. Es wird vermutet, dass dieses Ghrelin eher als ein parakriner Faktor auf die verschiedenen Organe wirkt und seine endokrine Rolle nur gering ausgeprägt ist (27).

Es wurde beobachtet, dass Patienten, die unter einem Kurzdarmsyndrom leiden anders als erwartet, niedrige Ghrelinplasmaspiegel aufweisen. Diese Erkenntnis ist ein Hinweis, dass nicht nur im Magen, sondern auch im Darm kleine Mengen von Ghrelin produziert werden. Die Ghrelin-produzierenden Zellen im Colon und im distalen Ileum sind im Gegensatz zu den Zellen des Magens sogenannte open-type cells (80).

Immunhistochemische Methoden haben gezeigt, dass Ghrelin sowohl im normalen als auch im neoplastischen endokrinen Pankreas vorhanden ist. Ghrelin wurde in den endokrinen α -Zellen und β -Zellen der Ratten und Menschen identifiziert (29). Die Tatsache aber, dass Ghrelin mit keinem von den bis jetzt bekannten pankreatischen Hormonen koexprimiert wird, deutet darauf hin, dass eigene Ghrelin-produzierende Zelltypen im Pankreas vorhanden sein könnten. In der Tat wurde vor kurzem gezeigt, dass Ghrelin auch in einer Fraktion von endokrinen Pankreaszellen, die sogenannten H-Zellen produziert wird (143). Im Fetus wird Ghrelin in einer endokrinen Zellpopulation des Pankreas produziert und sogar in größeren Mengen als im Magen (141).

Eine Ghrelinproduktion wurde ebenfalls in den Nieren der Mäuse beschrieben. Weiterhin wurde auch in den Zellen des Mesangiums von Ratten eine prepro-ghrelin-Produktion identifiziert. Dies ist ein Hinweis, dass Ghrelin auch in der Niere eine parakrine Rolle spielen könnte (94).

Vor kurzem wurde eine Ghrelinexpression in einer zuvor unbekannt Gruppe von Neuronen im 3. Ventrikel identifiziert. Diese Neurone weisen efferente Verbindungen mit anderen NPY-, AgRP-, POMC- und CRH produzierenden Nervenzellen, die für die Regulation der Nahrungsaufnahme eine Rolle spielen (24).

Trotzdem scheint der größte Anteil des im Hypothalamus vorhandenen Ghrelins von der Peripherie zu stammen (62).

Ghrelin und GHS-Rezeptoren wurden ebenfalls in menschlichen T-Zellen, B-Zellen und Neutrophilen unabhängig von ihrem Reifegrad identifiziert und sogar in solchen, die keine Bindungsstellen für das GH aufweisen. So könnte Ghrelin GH-unabhängige Wirkungen auf das Immunsystem entfalten (52).

Interessanterweise wird auch in der Plazenta Ghrelin produziert und zwar hauptsächlich in den Zytotrophoblasten. Seine Sekretion pendelt sehr stark im Verlauf der Schwangerschaft und seine physiologische Funktion, wenn es überhaupt eine gibt, ist noch unklar (49).

4.2.3.1.4 Funktion

4.2.3.1.4.1 Die Rolle des Ghrelins für die Regulation der Nahrungsaufnahme

Schon Jahre vor der Entdeckung des Ghrelins wurde beobachtet, dass einige GHS eine appetitstimulierende Wirkung in Nagetieren haben. Die Identifizierung von GHS-Rezeptoren im Hypothalamus und der Nachweis der Wirkung von GHS in dieser Region verstärkte später diese These. Mit der Entdeckung des Ghrelins als endogener Ligand des GHS-Rezeptors ist ein neuer, sehr potenter, appetitstimulierender Faktor zum Vorschein gekommen. Ghrelin ist das erste orexigene Signal, das aus dem Magen stammt.

Die Ghrelinapplikation bei Ratten führt zur Stimulation der Nahrungsaufnahme. Diese Wirkung ist dosisabhängig, tritt innerhalb von 60 Minuten auf und ist stärker nach zentraler als nach peripherer Gabe ausgeprägt. (152). Kontinuierliche Applikation des Ghrelins in den 3. Ventrikel führt dagegen zu einer potenten und konstanten Stimulation des Appetits in Ratten, ein Effekt, der durch periphere Gabe nicht erreicht werden kann (135). Auch bei Menschen stimuliert die intravenöse Gabe von Ghrelin in physiologischer Dosis, als Bolus oder als Infusion den Appetit (151).

Sowohl die chronische, intracerebroventrikuläre als auch die intermittierende, subcutane Applikation von Ghrelin in Nagetieren führen zur Gewichtszunahme, die mit einer Zunahme des Fettgehalts im Körper assoziiert ist. Dieser Effekt beginnt innerhalb von 48 Stunden und ist in 2 Wochen voll ausgeprägt (135). Die Gewichtszunahme nach Applikation des Ghrelins, lässt sich auch durch eine Hemmung des Energieverbrauchs und/oder eine Reduktion der Fettoxidation erklären (125).

Im Gegensatz zu anderen, potenten, orexigenen Substanzen (NPY, AGRP, MCH u.s.w.), die nur nach intrazerebraler Injektion wirksam sind, kann Ghrelin wie bereits erwähnt, seine Wirkungen auch nach peripherer Gabe entfalten. Das heißt nicht unbedingt, dass Ghrelin die Blut-Hirn-Schranke passieren muß oder kann, da viele von den Regionen des Hypothalamus, die für die Regulation der Nahrungsaufnahme essentiell sind, nicht komplett von der Blut-Hirn Schranke geschützt werden (90). Außerdem gibt es Hinweise, dass Ghrelin durch eine Aktivierung der aus dem Magen stammenden, afferenten Fasern des N. vagus seine appetitstimulierenden Signale ins ZNS vermitteln kann (6).

4.2.3.1.4.2 Die Wirkung des Ghrelins im ZNS

Nach den neuesten Erkenntnissen sind an der Entfaltung der appetitstimulierenden Ghrelinwirkung im ZNS zwei unterschiedliche Signalwege im Hypothalamus beteiligt. Der erste Weg der Signalübermittlung ist über die NPY-produzierenden Neurone und der zweite über die MCH- (Melanocortin) Rezeptoren und ihre agonistischen (POMC) und antagonistischen (AgRP) Liganden. Akute oder chronische Applikation von Ghrelin führt zur Stimulation der Expression der orexigenen Peptide AgRP und NPY (62). NPY scheint eher für die akute, appetitstimulierende Wirkung des Ghrelins wichtiger zu sein, während AgRP sowohl an der Entfaltung der chronischen als auch der akuten Wirkung beteiligt ist.

4.2.3.1.4.3 Gastrointestinale und pankreatische Effekte des Ghrelins

Sowohl die intravenöse, als auch die intracerebroventrikuläre Applikation von Ghrelin in Ratten und Menschen stimuliert die Magensäuresekretion und beschleunigt die Magenentleerung (87,30). Zusätzlich wurde von Lee et al. eine Erhöhung der Gastrinfreisetzung nach i.v. Ghrelingabe in Ratten beschrieben (81). Diese Effekte werden durch die Behandlung mit Atropin oder die bilaterale, zervikale Vagotomie blockiert (87). Daraus resultiert, dass Ghrelin verschiedene gastrointestinale Wirkungen über eine Vermittlung des N. vagus entfaltet.

Im Bezug auf die stimulierende Wirkung des Ghrelins auf die Magenentleerung zeigten Trudel et al. in einem Tiermodell, dass die Applikation von Ghrelin den postoperativ aufgetretenen, paralytischen Ileus positiv beeinflussen kann (134). Aufgrund seiner prokinetischen Wirkung könnte Ghrelin auch für die Diabetes mellitus-assoziierte Gastroparese eingesetzt werden.

Ghrelin kann die intrazelluläre Calciumkonzentration und somit die Insulinsekretion in isolierten β -Zellen aus dem Pankreas von Ratten stimulieren (29). Dagegen zeigten Broglio et al, dass die in vivo Applikation von Ghrelin beim Menschen zur Hyperglykämie und reduzierten Insulin-Sekretion führt (16). Eine Erklärung dafür wäre, daß in vivo zusammen mit Ghrelin auch andere endogene Faktoren die Regulation der Insulinsekretion beeinflussen können. Weiterhin berichteten Zhang et al, dass die intravenöse Infusion von Ghrelin (12 nmol/kg/h) die CCK- und vagal-induzierte, exokrine Sekretion des Pankreas in vivo hemmen kann. In vitro dagegen, tritt dieser Effekt nicht auf (157).

4.2.3.1.5 Die Rolle des Ghrelins in pathologischen Zuständen wie Adipositas, Tumorkachexie und Anorexia nervosa

Der Ghrelinplasmaspiegel weist generell eine negative Korrelation mit dem BMI, dem gesamten Fettgehalt des Organismus und der Größe der Adipozyten auf (137).

Tschop et al zeigten, dass adipöse Individuen niedrigere Ghrelinspiegel als normalgewichtige haben. Pima-Indianer, die eine Tendenz zur Entwicklung von Adipositas und Typ 2 Diabetes mellitus haben, weisen ebenfalls, unabhängig von ihrem BMI niedrigere Ghrelinplasmaspiegel als Kontrollindividuen auf (135,137). Die niedrigen Ghrelinplasmaspiegel bei Adipositas könnten eine physiologische Adaptation auf die lang andauernde, positive Energiebilanz reflektieren. Andererseits ist es möglich, dass Ghrelin zur Aufrechterhaltung von Adipositas beiträgt, da die Gewichtsabnahme bei adipösen Patienten zu einer proportionalen Erhöhung des Ghrelinplasmaspiegels führt (51). Darüber hinaus ist die postprandiale Senkung des Ghrelinspiegels bei adipösen Individuen im Vergleich zu Normalgewichtigen weniger ausgeprägt (39,41).

Vor kurzem publizierte Studien zeigten, dass Adipositas auch mit genetischen Variationen des Ghrelin-Gens assoziiert sein könnte. Korbonits et al. berichteten, dass adipöse Kinder, die einen Nukleotid-Polymorphismus (eine Aminosäure-Variation im Bereich des C-Terminals des preproghrelinproteins) aufweisen, einen höheren BMI und reduzierte Insulinsekretion haben (78). Ukkola et al. identifizierten weiterhin eine Mutation in der Position 51 (Arg51Gln) des preproghrelinproteins von adipösen Individuen und zeigten, dass eine Mutation des Kodons 72 (Leu72Met) mit early onset Adipositas assoziiert ist (138). Interessanterweise wurden auch bei Prader –Willi-Syndrom, eine der häufigsten Formen der genetisch bedingten Adipositas hohe Plasmaghrelinspiegel beobachtet. Man vermutet, dass diese gesteigerte Ghrelinexpression, die zur Hyperphagie führt, eher mit den genetischen Alterationen des Chromosoms 15, die für das PWS zuständig sind und weniger mit direkten Mutationen des Ghrelin-Gens assoziiert ist (32). Weitere Studien sind allerdings notwendig, um die genaue Beziehung zwischen genetischen Alterationen des Ghrelin-Gens und Adipositas zu definieren.

Anhand der orexigenen Wirkung des Ghrelins erscheint der Einsatz eines Ghrelin-Antagonisten für die Bekämpfung des Übergewichts logisch. In der Tat zeigten Asakawa et al., dass die intraperitoneale Applikation eines GHS-R- Antagonisten ([D-Lys-3]-GHRP-6) bei fastenden Mäusen (2-200 nmol/ Maus) die Nahrungsaufnahme hemmt. Der gleiche Effekt wurde auch bei fastenden ob/ob Mäusen demonstriert, allerdings bei höheren Dosen des GHS-R- Antagonisten (200 nmol/ Maus). Zuletzt

fürte die wiederholte, intraperitoneale Applikation des [D-Lys-3]-GHRP-6 bei ob/ob Mäusen (20-200 nmol/ Maus alle 12 h für 6 Tage) zur Gewichtabnahme und Senkung des Glukoseplasmaspiegels (5). Inwieweit diese Erkenntnisse auf dem Menschen übertragbar sind, ist jedoch unklar. Erstens ist es unsicher, dass die weitere Suppression des Ghrelins bei adipösen Patienten, wo der Ghrelinplasmaspiegel sowieso niedrig ist, einen Effekt haben könnte. Zweitens könnte der Antagonismus der Ghrelinrezeptoren als Nebenwirkung auch eine funktionelle GH-Insuffizienz verursachen und drittens wird vermutet, dass wie bei der NPY-knockout-Maus verschiedene kompensatorische Mechanismen die Wirkung des Antagonisten maskieren würden. Bis jetzt wurde bei Menschen kein Antagonist, aber ein inverser Agonist des Ghrelin-Rezeptors beschrieben (61).

Es ist bereits bekannt, dass der Gewichtsverlust ein potenter Stimulus für die Nahrungsaufnahme in Menschen und Tieren ist. Dementsprechend deutet die Persistenz der Anorexie bei Tumorerkrankungen auf ein Versagen der Kompensationsmechanismen hin. Für dieses Versagen könnten verschiedene Zytokinen, die mit Tumorerkrankungen assoziiert sind, verantwortlich sein. In der Tat führt die Gabe von IL- β zur Hemmung der Expression von Ghrelin-mRNA im Magen (66), während die periphere Ghrelinapplikation die IL-1 β induzierte Appetitlosigkeit und Kachexie aufhebt (6). Allerdings wurden bei kachektischen Patienten mit Lungenkrebs und anorektischen Patienten nach Chemotherapie erhöhte Ghrelinspiegel beschrieben (117). Weiterhin zeigten Wisse et al., dass auch in tumorkachektischen Ratten der Ghrelinspiegel hoch ist und die zentrale Ghrelinapplikation nicht in der Lage ist diese Anorexie aufzuheben (147). Insofern sind abgesehen von den Interleukinen, wahrscheinlich auch andere Mechanismen für die Ineffektivität des Ghrelins im Rahmen der Tumorkachexie verantwortlich. Trotzdem wird an dem potentiellen Einsatz des Ghrelins oder anderer GHS für die Behandlung der Tumorkachexie weiter geforscht. Draghia-Akli et al. zeigten, dass die intramuskuläre Injektion eines GHRH-exprimierenden Plasmids in tumor-leidenden Hunden die Tumorkachexie positiv beeinflusst (34).

Weiterhin haben auch Patienten mit Anorexia nervosa oder Bulimia nervosa höhere Ghrelinspiegel im Vergleich zu gesunden Individuen des gleichen Alters (26,130). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Ghrelinsekretion getriggert wird, um

weitere Energieverluste zu verhindern. Dafür spricht die Tatsache, dass die Gewichtszunahme bei Patienten mit Anorexia nervosa die erhöhten, basalen Ghrelinplasmaspiegeln wieder senkt (100). Erwähnenswert ist es auch, dass wie bei den adipösen Patienten, kein postprandialer Ghrelinabfall beobachtet wird (98). Unklar bleibt allerdings immer noch, inwiefern der erhöhte Ghrelinplasmaspiegel die Triggerung und die Aufrechterhaltung dieser beiden Erkrankungen beeinflussen kann.

4.2.3.1.6 Regulation der Ghrelinsekretion

Die Regulation der Ghrelinsekretion unterliegt der Wirkung diverser Mechanismen, die bis zum heutigen Tag nicht genau identifiziert wurden. Trotzdem gibt es mehrere Hinweise, dass jede akute oder chronische Änderung des Energiehaushalts, der N. vagus und verschiedene Hormone seine Sekretion direkt oder indirekt beeinflussen können. Die meisten Studien mit diesem Thema fokussieren auf das, im Magen produzierte Ghrelin, da der größte Anteil des zirkulierenden Ghrelins aus diesem Organ stammt. Ob die gleichen Mechanismen für die Regulation des extragastrointestinal produzierten Ghrelins verantwortlich sind, ist bis zum heutigen Tag genauso unklar, wie seine biologische Relevanz (153).

Der Ghrelinplasmaspiegel des Menschen steigt bei Hunger und Hypoglykämie, sinkt nach Einnahme einer kohlenhydrathaltigen oder eiweißhaltigen Mahlzeit innerhalb von 90 Minuten ab und kehrt anschließend auf das Ausgangsniveau zurück (136,25). Fettthaltige Mahlzeiten, die keine Kohlenhydrate enthalten, führen dagegen zu einer Stimulation des postprandialen Ghrelinspiegels (41). Außerdem hat die Magendehnung keine Effekte im Bezug auf die Ghrelinsekretion (40). Insgesamt scheint also Ghrelin an der akuten Hunger- /Sättigungsregulation beteiligt zu sein.

4.2.3.2 Leptin

4.2.3.2.1 Entdeckung, Struktur

Im Jahre 1953 behauptete Kennedy (71) zum ersten Mal, dass die Langzeitregulation des Körpergewichts von einem humoralen Faktor beeinflusst wird, der in Adipozyten, proportional zu der Menge des gespeicherten Fettes produziert wird. Erst nach 40 Jahren führte aber die Klonierung des sogenannten „Adipositas-Gens“ (ob-Gen) aus den ob/ob Mäusen zur Identifizierung dieses humoralen Faktors, der Leptin genannt wurde (auf griechisch leptos = dünn) (158). Das ob-Gen wird primär im Fettgewebe der meisten Säugetiere exprimiert und kodiert für Leptin, ein Protein, das aus 167 Aminosäuren besteht, eine Zytokin-ähnliche Struktur hat und das Molekulargewicht von 16- kDa aufweist (158). Bei der ob/ob Maus handelt es sich um eine adipöse Maus mit einer Mutation im ob-Gen, die zur fehlenden Leptinproduktion führt. Die db/db Maus ist dagegen eine adipöse Maus, die eine Mutation im Gen, das für den Leptinrezeptor kodiert, hat.

4.2.3.2.2 Lokalisation

Im Laufe der Zeit wurde entdeckt, dass Leptin nicht nur in Adipozyten, sondern auch in vielen anderen Gewebsarten und Organen produziert wird, wie der Magen (8,124,23,103), das Pankreas (77), die Skelettmuskulatur (145), die Hypophyse (67) und die Plazenta (88).

Leptin ist auch im Liquor nachweisbar, allerdings in einer Konzentration, die ungefähr 1/10 der Blutkonzentration entspricht. Bjorbaek et al. berichteten 1998 über die Anwesenheit von Leptinrezeptoren auf den Endothelzellen der Blut-Hirn Schranke von Ratten, die dem Transport des Leptins ins ZNS dienen (13). Bei steigendem Leptinplasmaspiegel sinkt aber der Quotient Liquor-Leptin / Plasma-Leptin. Dieser

Befund deutet darauf hin, dass der ZNS-Transportmechanismus des Leptins bei höheren Plasmaspiegeln gesättigt werden kann (116).

4.2.3.2.3 Leptinrezeptor: Struktur und Verteilung

Der Leptinrezeptor gehört zu der Familie der Klasse 1- Zytokinrezeptoren und besteht aus einem großen extrazellulären Anteil und einem etwas kleineren, intrazellulären Anteil (131). Bis zum heutigen Tag wurden vier Subtypen von Leptinrezeptoren identifiziert: OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc und OB-Re. Die Leptinaffinität ist bei allen Subtypen ähnlich. Die lange Form des Leptinrezeptors (Subtyp OB-Rb) unterscheidet sich von den anderen Subtypen insofern, dass sie einen längeren intrazellulären Anteil hat und somit die wichtigste, für die Entfaltung der inhibitorischen Leptinwirkung auf die Nahrungsaufnahme ist (2,120).

Leptinrezeptoren wurden in fast allen vorhandenen Gewebsarten identifiziert. Im Hypothalamus dominiert der OB-Rb, obwohl er in den meisten Geweben seltener als die anderen Subtypen des Leptinrezeptors zu finden ist (120). Mithilfe des Verfahrens von in situ Hybridisierung wurde eine starke Expression von OB-Rb-mRNA im ARC, VMN, PVN und LH von Mäusen beobachtet (69). Die lange Form des Leptinrezeptors OB-Rb wurde auch auf NPY- und POMC- produzierenden Neuronen in ARC und auf MCH- und Orexin- produzierenden Neuronen in LH identifiziert (50). Neuerdings wurden Leptinrezeptoren auch in weiteren Subpopulationen von Neuronen außerhalb des Hypothalamus identifiziert. Aus den gesamten bisherigen Erkenntnissen resultiert aber, dass der Nucleus arcuatus (ARC) am sensibelsten gegenüber der Applikation von Leptin reagiert (69).

Verschiedene Subtypen des Leptinrezeptors wurden auch im Magen, im Duodenum, im Jejunum, im Ileum (131,19), im Ganglion nodosum und an den afferenten Fasern des N. vagus (17) identifiziert.

4.2.3.2.4 Leptin-signaling, Leptinresistenz

Die intrazelluläre Signaltransduktion von Leptin weist einige Gemeinsamkeiten mit der von Zytokinen auf. Die Bindung des Leptins am Rezeptor führt, mittels der Öffnung von ATP-abhängigen K-Kanäle zur Aktivierung von entweder einem Transkriptionsfaktor (STAT3 – signal transducer and activator of transcription 3), oder einer Tyrosinkinase (Janus-Kinase, JAK). Diese Aktivierung steigert die c-fos-Expression, die ihrerseits modulierend auf die Produktion von anorexigenen und orexigenen Substanzen wirkt (2,14). Außerdem berichteten vor kurzem Bjorback et al. (12), dass Leptin die Expression von einem intrazellulären Protein namens SOC-3 (supressor of cytokine-signaling 3) aktivieren kann. Die übermäßige Expression von SOC-3 kann allerdings die Leptin-induzierte Signaltransduktion blockieren. Dementsprechend handelt es sich bei SOC-3 um einen von Leptin selbst-induzierten, negativen Regulator der Leptin-Signaltransduktion, der bei der Pathophysiologie der Leptinresistenz eine Rolle spielen könnte.

Heutzutage werden allerdings mehrere Ursachen für die Entstehung der Leptinresistenz diskutiert (69). Die wichtigsten davon sind :

- Mutationen im Gen, das für den Leptinrezeptor kodiert
- Defekte beim Transportmechanismus des Leptins ins ZNS
- Defekte bei der Signaltransduktion des Leptins
- Übermäßige Expression von SOC-3

4.2.3.2.5 Die Wirkung des Leptins im ZNS

Der Hauptwirkungsort des Leptins im ZNS ist, wie bereits erwähnt der Hypothalamus. Die genaue Bestimmung der hypothalamischen Kerne, die an der Entfaltung dieser Wirkung beteiligt sind, ist Gegenstand zahlreicher Studien, die zum

Teil kontroverse Ergebnisse liefern. Leptin hemmt die Nahrungsaufnahme indem es primär, entweder die Freisetzung und Wirkung von orexigenen Signalen hemmt oder/und die von anorexigenen Signalen im ZNS stimuliert (102). Somit kann die tägliche Injektion von Leptin das Körpergewicht in Ratten reduzieren, indem sie die NPY- und AgRP induzierte Nahrungsaufnahme hemmt. Leptin hemmt außerdem hauptsächlich indirekt, (durch seine Wirkung auf NPY) aber auch auf direktem Wege die Expression der orexigenen Peptiden Galanin, MCH und Orexin im lateralen Hypothalamus (109). Dagegen stimuliert die zentrale Applikation von Leptin die Expression der anorexigenen Peptide POMC und CART im Nucleus arcuatus (22).

4.2.3.2.6 Leptin und Adipositas

Die chronische Überernährung und die Zunahme des Fettgewebsanteils im Organismus führt zur Erhöhung des Leptinspiegels im Blut. Dagegen bleibt der Leptinspiegel direkt postprandial relativ konstant (76). So versucht Leptin die Energieaufnahme einzuschränken und die Energieverwertung zu erhöhen, mit dem Ziel der Erhaltung des Energiegleichgewichts (22). Leptininsuffizienz oder Leptinresistenz sind zwei Faktoren, die für die Entstehung von Adipositas mitverantwortlich gemacht werden. Leptininsuffizienz wurde außer bei Nagetieren auch bei Menschen beobachtet, ist aber eher selten. 1997 wurde zum ersten Mal über zwei Mädchen aus Pakistan berichtet, die wegen eines defekten Ob-Gens unter schwerer Adipositas litten (92). Bei den meisten übergewichtigen Patienten ist aber der Leptinspiegel im Blut hoch, während Patienten mit Anorexia nervosa konstant niedrige Leptinspiegel aufweisen (48).

Zahlreiche Studien bei übergewichtigen oder gesunden Nagetieren haben gezeigt, dass die chronische, periphere (intravenöse, intraperitoneale oder subkutane) oder zentrale Applikation von Leptin die Nahrungsaufnahme hemmt und einen Gewichtsverlust induziert (69). Die Gabe von Leptin bei adipösen Patienten oder Probanden mit BMI im Normbereich führt dagegen zu einem nur bescheidenen und variablen Gewichtsverlust (60). Nur bei Patienten, die eine Leptininsuffizienz

aufweisen, führt die Leptingabe, genauso wie bei der ob/ob Maus zu einer deutlichen Senkung der Polyphagie und des Körpergewichts und zu einer Wiederherstellung der Fertilität und der TRH-Sekretion (42).

Die Entdeckung des Leptins vor 12 Jahren öffnete neue Perspektiven beim Verständnis der Pathogenese von Adipositas. Aus den Ergebnissen der obengenannten Studien wurde allerdings schnell klar, dass der direkte medikamentöse Einsatz dieses Hormons bei der Bekämpfung des Übergewichts eine untergeordnete Rolle spielt und das, obwohl Leptin ein grundlegender Faktor für die Regulation der Nahrungsaufnahme ist.

4.2.3.2.7 Regulation der Leptinsekretion

Der Leptinspiegel im Blut korreliert besser mit dem Anteil des Gewichts an Fettgewebe als mit dem Körpergewicht selbst (69). Er ist bei Frauen 3-4 mal höher als bei Männern mit identischem BMI. Dieser Unterschied lässt sich aber nicht durch den Effekt der weiblichen Geschlechtshormone erklären, da der Leptinspiegel sowohl prä- als auch postmenopausal oder nach Hormonsubstitutionstherapie keine Veränderungen aufweist. Vielmehr gibt es Hinweise, dass die hemmende Wirkung der Androgene oder die unterschiedliche, körperliche Verteilung des Fetts bei Männern und Frauen zu diesen Alterationen des Leptinspiegels führen könnten (54).

Die Konzentration des zirkulierenden Leptins im Plasma unterliegt beim Menschen einen täglichen Rhythmus. Sie ist während der Morgenstunden am niedrigsten und beginnt ab 12.00 Uhr zu steigen. In der Nacht erreicht sie dann zwischen 24.00 und 4.00 Uhr ihren höchsten Wert, bevor sie wieder zu fallen beginnt (119). Allerdings ist das Auftreten des nächtlichen Gipfels des Leptinspiegels von dem Zeitpunkt der aufgenommenen Mahlzeiten abhängig (114). Außerdem wird dieser tägliche Rhythmus unter Nahrungskarenz nicht beobachtet. Deswegen scheint die Leptinsekretion keinen echten zirkadianen Rhythmus zu unterliegen, wie es zum Beispiel der Fall bei der Cortisonsekretion ist (55). Die pulsatile Sekretion des Leptins bleibt auch bei adipösen

Patienten erhalten, bei denen werden aber höhere Amplituden erreicht. Die oben genannten Kenntnisse führen zu der Annahme, dass neurale oder neurohumorale Komponenten im ZNS, an der Regulation des täglichen Leptinspiegels mitbeteiligt sein könnten.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass auch Glucose und Insulin die Leptinsekretion modulieren können. Die Applikation von Insulin sowohl in physiologischen, als auch in supraphysiologischen Dosen stimuliert die Leptinproduktion beim Menschen (139,108). Den gleichen Effekt zeigt auch die Infusion von Glukose beim Affen (53). Diverse Studien zeigten außerdem, dass bei Nahrungskarenz der niedrige Leptinspiegel im Blut mit dem Glucoseplasmaspiegel korreliert.

Von besonderem Interesse sind aber die Verhältnisse beim Diabetes mellitus Typ 1. Der absolute Insulinmangel beeinträchtigt massiv die Glukoseverwertung und führt so zur Hemmung der Fettsynthese und zur Gewichtsabnahme. Der Leptinspiegel bleibt deswegen, trotz des hohen Glucoseplasmaspiegels auf einem niedrigen Niveau und der Patient neigt zur Polyphagie. Eine Studie bei diabetischen Ratten hat tatsächlich gezeigt, dass die chronische, niedrigdosierte Leptingabe das Auftreten der Diabetes Typ 1-assoziierten Polyphagie verhindern kann (118).

Interessanterweise ist auch bei Diabetes mellitus Typ 2 der Leptinspiegel relativ niedrig. Daraus resultiert, dass die Insulin-induzierte Glukoseverwertung und nicht das Insulin selbst für die Regulation der Leptinproduktion verantwortlich ist. Die Substitution von Leptin bei diesen Patienten führt zu einer deutlichen Besserung der Insulinresistenz, der Hyperglykämie und der Dyslipidämie (47).

4.2.3.2.8 der Einfluss des Leptins auf die Ghrelinsekretion in vivo und in vitro

Abgesehen von der prä- und postprandialen Kurzzeitregulation der Ghrelinsekretion, korreliert der Ghrelinspiegel im Blut wie bereits erwähnt auch mit dem jeweiligen Ernährungszustand des Individuums. Die Tatsache, dass adipöse Patienten niedrige Ghrelinspiegeln aufweisen (137), während in kachektischen Individuen der

Ghrelinspiegel eher hoch ist (66), lässt vermuten, dass auch Faktoren des Fettgewebes, die proportional zum Fettgehalt des Körpers synthetisiert werden, wie das Hormon Leptin, die Ghrelinfreisetzung beeinflussen. Unter diesen Umständen könnte die Adipositas-assoziierte Reduktion des Ghrelinplasmaspiegels das Ergebnis erhöhter Leptinkonzentrationen sein (83). Die inverse Beziehung zwischen Ghrelin und Leptin im Plasma von adipösen Individuen wurde in mehreren Studien beschrieben und erreicht ihr Maximum bei einem BMI von 27 kg/m^2 (41,107,137). Insofern scheint eine periphere Interaktion zwischen diesen beiden Hormonen sehr wahrscheinlich.

In diesem Zusammenhang zeigten Asakawa et al, dass die intraperitoneale Applikation von Leptin in normalen Mäusen und Ratten zu einer Reduktion der Ghrelin-mRNA führt (6). Barazzoni et al. beobachteten weiterhin, dass die Hyperleptinämie die Erhöhung der Plasmaghrelinkonzentration in fastenden Ratten verhindern kann (7). Dagegen zeigten andere Studien, dass die intraperitoneale Leptinapplikation in fastenden ob/ob Mäusen keine Effekte auf den Ghrelinplasmaspiegel hat, während die chronische intraperitoneale Applikation in db/db Mäusen, im Vergleich zu normalen Mäusen sogar die Ghrelin-mRNA erhöhen kann (4,133). Zu einer Erhöhung des Ghrelinplasmaspiegels führt auch die intracerebroventrikuläre Leptin-Gen Therapie (11).

Auch bei Menschen zeigte die subkutane Leptinapplikation in physiologischen und pharmakologischen Dosierungen sowohl bei fastenden, als auch bei normal ernährten Individuen keinerlei Effekte auf den Ghrelinplasmaspiegel (21).

Die teils kontroversen Ergebnisse der obengenannten Studien deuten auf eine sehr komplexe Interaktion zwischen Ghrelin und Leptin *in vivo*, bei der weitere neuroendokrine oder metabolische Faktoren eine Rolle spielen könnten. Um diese Faktoren soweit wie möglich auszuschließen, wurde die direkte Wirkung des Leptins auf die Ghrelinfreisetzung des isolierten Rattenmagens *in vitro* untersucht. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit resultiert, dass die *in vitro* Applikation von Leptin zu einer deutlichen Hemmung der Ghrelinfreisetzung führt. Dieser Effekt ist über eine große Konzentrationsspanne und sogar auch bei sehr niedrigen Konzentrationen (bis zu 10^{-12} M) mit Signifikanz nachweisbar. Der gleiche Effekt konnte auch bei einer Studie von Kamegai et al. gezeigt werden (70).

Aus der vorliegenden Arbeit resultiert, dass Leptin ein potenter Inhibitor der Ghrelinfreisetzung des Magens ist, der von allein wirken kann, obwohl ein Synergismus mit anderen neuroendokrinen oder metabolischen Faktoren nicht auszuschließen ist. Insgesamt scheinen sowohl die biologischen Effekte des Ghrelins, als auch die Regulation seines Plasmaspiegels im Bezug auf die akuten und chronischen Veränderungen des Ernährungszustandes des Individuums, entgegengesetzt mit denen von Leptin zu sein.

4.2.3.2.9 der Einfluss des Insulins und die Kombination von Insulin und Leptin auf die Ghrelinsekretion in vivo und in vitro

Insulin ist ein Hormon, das in den endokrinen β -Zellen des Pankreas produziert wird. Zum ersten Mal wurde 1970, von Woods und seinen Mitarbeitern, auf die Rolle des Insulins als tonischer Regulator der Nahrungsaufnahme hingewiesen (148). Die Insulinkonzentration im Blut ist proportional sowohl zur gesamten Körperfettmenge, als auch zu der letztens aufgenommenen Menge von Kohlenhydraten und Proteinen (104). Das bedeutet, dass in einem schwerem Individuum, bei einer bestimmten Glukosekonzentration mehr Insulin sezerniert wird, als in einem vergleichsweise dünneren Individuum.

Der hohe Insulinspiegel bei adipösen Individuen wäre insofern eine weitere Möglichkeit den niedrigen Ghrelinplasmaspiegel zu erklären. Verschiedene Studien in vivo unterstützen diese These. Flanagan et al. zeigten, dass die intravenöse Insulinapplikation in normoglykämischen Individuen zu einer Senkung des Ghrelinspiegels führt. Dieser niedrige Ghrelinspiegel persistiert auch unter hypoglykämischen oder hyperglykämischen Bedingungen (43). Auch Möhlig et al. berichteten über eine 50% Senkung des Ghrelinplasmaspiegels unter hyperinsulinämischen, normoglykämischen Bedingungen (91). Die umgekehrte Beziehung zwischen Ghrelin und Insulin wird weiterhin durch die Beobachtung einer Erhöhung des Ghrelinspiegels in insulin-defizienten, diabetischen Ratten unterstützt (86).

Auch für die postprandiale Hemmung des Ghrelinspiegels nach Konsumierung von kohlenhydratreichen Mahlzeiten könnte die Erhöhung des Insulinplasmaspiegels verantwortlich sein (40).

Dagegen gibt es einige Studien, die diese umgekehrte Korrelation zwischen diesen beiden Hormonen nicht bestätigen (18,112). Um soweit wie möglich systemische Interaktionen auszuschließen wurde die Wirkung des Insulins auf die Ghrelinfreisetzung in vitro untersucht. Insulin zeigte sich als ein potenter Inhibitor der Ghrelinfreisetzung des isolierten Rattenmagens (84,70).

Im Hinblick auf die inhibitorische Wirkung sowohl des Leptins, als auch des Insulins auf die Ghrelinfreisetzung in vitro stellt sich die Frage inwieweit diese beiden Hormone synergistisch wirken können. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die kombinierte Applikation von Leptin und Insulin in einer, jeweils bezüglich der Ghrelininhibition unwirksamen Konzentration zeigte keinerlei signifikante Effekte. Daraus resultiert, dass obwohl beide Hormone als tonische Regulatoren des Energiehaushalts gelten, nicht synergistisch auf die Hemmung der Ghrelinfreisetzung wirken.

4.2.3.3 Orexin A und Orexin B

4.2.3.3.1 Entdeckung

1998 wurden von 2 verschiedenen Arbeitsgruppen, zum ersten Mal die orexigenen, hypothalamischen Neuropeptide Orexin-A und Orexin-B (Hypocretin 1 und 2) beschrieben. Ihr Name stammt aus dem griechischen „orexis“, was Appetit bedeutet. Einerseits erwähnten Lecea et al. (31) in ihrer Arbeit die Entdeckung von einer hypothalamisch-spezifischen mRNA, das preprohypocretin kodiert, ein Protein bestehend aus 130 Aminosäuren. Aus der Spaltung dieser Substanz entstehen dann 2 Peptide (Orexin-A und Orexin-B), die ähnliche Struktur mit den gastrointestinalen Hormonen Sekretin, VIP und GIP aufweisen. Andererseits publizierten kurz danach

Sakurai et al. (110) über die Entdeckung von 2 eng verwandten Liganden für einen, vorher identifizierten, G- protein-gekoppelten, „ orphan receptor“.

4.2.3.3.2 Struktur, Lokalisation, Rezeptoren

Beim Menschen ist das prepro-Orexin Gen auf dem Chromosom 17q21 lokalisiert (111). Orexin-A besteht aus 33 Aminosäuren, während Orexin-B aus 28 besteht und eine, zu 46 % identische Sequenz mit Orexin-A hat. Die Struktur des Orexins-A ist identisch bei den Ratten, den Mäusen und den Menschen (79).

Im ZNS der Ratte wurden bis jetzt immunreaktive Orexin-Neurone in der Area perifornicalis, im lateralen und im dorsalen Hypothalamus identifiziert. Sie weisen zahlreiche Projektionen sowohl zu benachbarten hypothalamischen Nuclei, als auch zu anderen Hirnregionen (cerebrale Cortex, Hippocampus, Thalamus, Amygdala, Area postrema, Area tegmentalis, Locus coeruleus, NTS, Spinalmark) auf (110). Auch beim Menschen ist die Verteilung der Orexin-Neurone im ZNS ähnlich (93).

In der Peripherie wurden ebenfalls immunreaktive Nervenzellen, die Orexin speichern, entdeckt, nämlich im Hodengewebe, in der Hypophyse, in der Niere, in der Nebenniere, im Plexus submucosus und Plexus myentericus, in den α - und β -Zellen des Pankreas und interessanterweise auch in enterochromaffinen Zellen des Darms (72,73,97) und in Gastrin-produzierenden Zellen des Magenantrums (37).

Orexine aktivieren 2 eng verwandten, G-protein-gekoppelten Rezeptoren, die Orexin-1 (OX1R) und Orexin-2 Rezeptor (OX2R) genannt werden und eine 65%ige Ähnlichkeit in ihrer Struktur aufweisen. Orexin A hat die gleiche Affinität zum OX1R und OX2R, während Orexin B eine 10fach höhere Affinität zum OX2R zeigt (110). Die Bindung der Orexine an diesen Rezeptoren führt entweder zur Aktivierung der cAMP-, oder der IP3-Kaskade (140).

4.2.3.3.3 Funktion

4.2.3.3.3.1 Die Rolle der Orexine bei der Regulation der Nahrungsaufnahme

Die Bedeutung der Orexine als appetitstimulierende Faktoren wurde mittlerweile genauer untersucht. Orexin-B weist im Vergleich zu Orexin-A eine schwächere und in vielen Studien sogar nicht nachweisbare, appetitstimulierende Wirkung auf, etwas, das sich durch den schnelleren in vivo Abbau dieses Moleküls erklären lassen könnte (36). Die orexigene Potenz von Orexin-A ähnelt der von MCH und Galanin, ist aber vergleichsweise kleiner als die Potenz von NPY (58,110).

Allein die bestehenden Verbindungen der Orexin Neurone mit verschiedenen Zentren des Hypothalamus und des ZNS allgemein, und die Expression von Leptinrezeptoren an Orexin Neuronen (44) sind neurophysiologische Indizien, die eine Beteiligung der Orexine an der zentralen Regulation der Nahrungsaufnahme sehr wahrscheinlich machen.

Die prolongierte Nahrungskarenz und die Insulin –induzierte Hypoglykämie steigern die Expression von preproorexin mRNA und die Aktivität der Orexin Neuronen im Hypothalamus (110).

Weiterhin führt die akute, intracerebroventrikuläre Applikation von Orexin-A, aber nicht von Orexin-B zur dosisabhängigen, gesteigerten Nahrungsaufnahme sowohl bei männlichen, als auch bei weiblichen Ratten, während die intravenöse Gabe keine derartigen Ergebnisse hat (58). Die gesteigerte Nahrungsaufnahme, sowie eine Verlängerung der Essenszeit treten nur während der Lichtphase des Tages auf, aber nicht in der Nacht. Außerdem ist diese Wirkung in älteren Ratten nicht nachweisbar (129).

Neben den akuten Effekten, wurde auch der Einfluss des Orexins-A auf der Nahrungsaufnahme bei chronischer, zentraler Applikation untersucht. Die chronische Gabe führt bei Ratten zur Erhöhung der Nahrungsaufnahme während des Tages, aber zur kompensatorischen Reduktion während der Nachtstunden. Auf Dauer gesehen, führt somit die Gabe von Orexin-A zu keinerlei Veränderungen in der 24h Nahrungsaufnahme, im Körpergewicht und in den Plasmaspiegeln von Glukose, Insulin,

Leptin, Triglyzeride und Cholesterin. Diese Kenntnis verstärkt die These, dass Orexine eher an der akuten Regulation des Energiehaushalts beteiligt sind (58,156).

Anhand der vorherigen Daten führt wie erwartet, die zentrale, aber nicht periphere Applikation von anti-Orexin-A oder anti-OX1R-Antikörpern (154,123), die Ausschaltung der Orexin-Gene oder die genetische Ablation der Orexin Neuronen zur einer Reduktion der Nahrungsaufnahme in Ratten. Interessant ist aber die Tatsache, dass Orexin-knock-out Ratten trotz Unterernährung auf die Dauer ein normales Wachstumprofil aufweisen. Parallel dazu werden Ratten mit einer Hyperexpression von Orexin-Gen nicht adipös (106). Dies ist ein weiteres Indiz, dass Orexine eher an der akuten Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind und ihre appetitstimulierende Wirkung auf die Dauer von anderen Faktoren kompensiert wird.

Unklar ist es noch, inwieweit die in der Peripherie produzierten Orexine an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind. Die Tatsache, dass die intravenöse Gabe von Orexin-A, im Gegensatz zu der intracerebroventrikulären, keinerlei Effekte auf die Nahrungsaufnahme zeigt, macht so eine Beteiligung eher unwahrscheinlich. Allerdings wird bei Hunger und Hypoglykämie eine verstärkte Expression von Orexin-A aus den endokrinen Zellen des Magens und Darms beobachtet, die zum Anstieg des Orexinplasmaspiegels beiträgt (79).

4.2.3.3.2 Gastrointestinale und pankreatische Effekte der Orexine

Wie bereits erwähnt, wurde sowohl im Magen, als auch im Darm und Pankreas der Menschen und Ratten eine Produktion von Orexinen identifiziert (79). Es erscheint insofern sehr wahrscheinlich, dass für die diversen gastrointestinalen Wirkungen auch die in der Peripherie produzierten Orexine eine Rolle spielen könnten.

Die intrathekale Injektion von Orexin-A bei Ratten führt zu einer phasischen Kontraktion des distalen Magens und zu einer Relaxation des proximalen Magens (74). Takahashi et al. zeigten weiterhin, daß die zentrale Applikation von Orexin-A, aber nicht Orexin-B die Magensäuresekretion stimuliert (128). Dagegen hat die intravenöse

Applikation von Orexin-A in Ratten keinerlei Effekte auf die basale und Pentagastrin-stimulierte Magensäuresekretion (79).

Nowak et al. zeigten, dass die subkutane Injektion von Orexin-A in vivo bei Ratten den Plasmaspiegel von Glukose und Insulin steigert, während die Injektion von Orexin-B nur den Insulinspiegel, aber nicht den Glukosespiegel im Plasma erhöht (99). Dagegen zeigten Ouedraogo et al., dass die in vivo, kontinuierliche, hochdosierte, i.v. Applikation von Orexin-A bei Ratten den Glucagon- und Glukosespiegel im Plasma erhöht und den Insulinspiegel erniedrigt (101). Bei anderen Studien hatte wiederum die intravenöse Gabe von Orexinen keinerlei Effekte auf den Glukose- und Insulinplasmaspiegel. Trotz der zum Teil kontroversen Ergebnissen resultiert aus den obengenannten Studien, dass Orexine die adipo-insulinäre Achse beeinflussen können.

4.2.3.3.4 Orexin-Rezeptor -Antagonisten

Bis zum heutigen Tag basierte die Forschung über die Wirkung der Orexine im ZNS an die intracerebroventrikuläre (ICV) oder intracerebrale Gabe (IC) dieser Peptide. Diese Methode hatte aber den Nachteil, dass es unklar war, ob die Höhe der exogen applizierten Dosen eine physiologische Relevanz hatte. Die Lösung zu diesem Problem gab die Entdeckung von spezifischen Orexin-Rezeptor-Antagonisten. Der potenteste und am meisten spezifisch von denen, ist der OX1R-Antagonist SB-334867 (1-[2-Methylbenzoxazol-6-yl]-3-[1,5] naphthyridin-4-yl-urea HCl). Er hat nanomolare Affinität zum OX1R, mindestens 50-fache Selektivität zum OX2R und zu vielen anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren und passiert die Blut-Hirn Schranke bei systemischer Gabe (121). Diese Entdeckung war sehr wichtig für das weitere Verstehen der physiologischen Wirkung von endogenen Orexinen.

4.2.3.3.4.1 Funktion

Es wurden bereits einige Studien publiziert, die sich mit der Blockade des OX1R von dem spezifischen Antagonisten SB-334867 beschäftigen. Haynes et al. zeigten, daß die akute, systemische Vorbehandlung mit diesem Orexin-Antagonisten die, durch die ICV-Gabe von Orexin-A induzierte Hyperphagie in Ratten, blockieren kann (57). Weiterhin führt die alleinige, periphere Gabe von SB-334867 zur Hemmung der Nahrungsaufnahme nicht nur bei fastenden Ratten während der Nachtstunden, sondern auch bei nicht fastenden Ratten im Laufe des Tages (105,57). Das Ergebnis ist vergleichbar mit der akuten Applikation von anti-Orexin-A- Antikörpern, jedoch ist die Unterdrückung der Nahrungsaufnahme längeranhaltend und über 24 Stunden nachweisbar. Außerdem wird in diesem Fall nach 3 Tagen auch eine Gewichtsreduktion beobachtet (106).

Im Zusammenhang mit den obengenannten Beobachtungen ist es auch erwähnenswert, dass die chronische (14-tägige) Gabe des OX1R Antagonisten in ob/ob Mäusen nicht nur die tägliche Nahrungsaufnahme, sondern auch auf Dauer das Körpergewicht und den Plasmaspiegel von Glucose und Insulin reduziert. Somit könnte dieser Antagonist zukünftig eine Rolle in der Behandlung von Adipositas und Diabetes Mellitus Typ 2 spielen (56).

Zuletzt blockiert die periphere Gabe des OX1R Antagonisten SB-334867 die Orexin-A induzierte Stimulation der intestinalen Motilität und der Magensäuresekretion (155,79).

4.2.3.3.5 Der Einfluss der Orexine und des Orexin-Antagonisten SB-334867 auf die Ghrelinsekretion in vivo und in vitro

Es ist bereits bekannt, dass Ghrelin nicht nur in der Peripherie, sondern in geringem Ausmaß auch im ZNS produziert wird (63). Ghrelinrezeptoren wurden an mehreren Stellen im ZNS identifiziert, unter anderen auch im Nucleus arcuatus und im

lateralen Hypothalamus. Die zentrale Applikation von Ghrelin entfaltet eine appetitstimulierende Wirkung über dem NPY- und dem AgRP-System (62). Die Interaktion zwischen Ghrelin und anderen hypothalamischen, orexigenen Neuropeptiden wurde allerdings bis zum heutigen Tag nur wenig untersucht. Orexin-A und Orexin-B sind zwei solche Neuropeptide, die hauptsächlich im lateralen Hypothalamus und in der Area perifornicalis produziert werden und stimulierend auf die Nahrungsaufnahme wirken.

Toshinai et al. zeigten, dass die in vivo intracerebroventrikuläre Ghrelinapplikation zu einer erhöhten Expression von c-Fos (Marker zur Beurteilung der neuralen Aktivierung) in Orexin-produzierenden Neuronen führt. Diese Wirkung wird durch die Gabe von Anti-Orexin-A IgG und Anti-Orexin-B IgG, aber nicht durch die Gabe von Anti-NPY IgG aufgehoben. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Ghrelin-induzierte Stimulation der Nahrungsaufnahme bei Orexin-knockout Mäusen suprimiert ist (132). Aus dieser Studie resultiert, dass Ghrelin und Orexine im Rahmen der Regulation der Nahrungsaufnahme auf hypothalamischer Ebene interagieren.

Interessanterweise wurde auch in der Peripherie eine Orexinproduktion in endokrinen Zellen des Darms und des Magens identifiziert (97,37,38). Orexine werden, ähnlich wie Ghrelin bei Hunger oder Hypoglykämie verstärkt aus dem Magenantrum und dem Darm freigesetzt (79). Außerdem weist der Plasmaspiegel des Orexins-A bei adipösen Individuen genauso wie der Plasmaspiegel des Ghrelins eine negative Korrelation mit dem BMI auf (1). Insofern wäre eine Interaktion zwischen Orexinen und Ghrelin auch auf peripherer Ebene theoretisch denkbar. Diese Vermutung wird durch die Studie von Levin et al. unterstützt. Sie zeigten, dass die intravenöse Applikation von Ghrelin bei Ratten die Plasmakonzentration von Orexin-A reduziert (82). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der Applikation von Orexin-A oder Orexin-B in verschiedenen Konzentrationen auf die in vitro Ghrelifreisetzung des vagal vorstimulierten Rattenmagens untersucht. Zu erwarten wäre, dass Orexine eher stimulierend auf die Ghrelinsekretion wirken würden, da beide Hormone als orexigene Signale zählen. Dagegen zeigte sich eine hemmende Tendenz sowohl des Orexins-A, als auch des Orexins-B auf die Ghrelinfreisetzung. Der Effekt war allerdings in keinem der Versuche signifikant.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt der Applikation von dem spezifischen Orexin-Antagonisten SB-334867 in verschiedenen Konzentrationen auf die *in vitro* Ghrelinfreisetzung des Rattenmagens, mit und ohne vagaler Vorstimulation untersucht. Auch bei diesen Versuchen zeigten sich keinerlei signifikante Effekte. Somit scheint die endogene Orexinsekretion des Magens im Bezug auf die Ghrelinfreisetzung und die Regulation der Nahrungsaufnahme unbedeutend zu sein.

4.2.4 Der N. vagus und seine Bedeutung bei der Regulation der Nahrungsaufnahme

Der Nervus vagus ist der zehnte Hirnnern und hat das weiteste Innervationsgebiet von allen, das bis hin in den Brust- und Bauchraum reicht. Er setzt sich aus viszeromotorischen, sensorischen, sensiblen und viszerosensiblen Fasern zusammen. Seine vier Kerngebiete befinden sich in der Medulla oblongata.

Die viszeroafferente Fasern des N. vagus sind für die Weiterleitung von verschiedenen Signalen aus dem GIT und dem hepatoportalen System ins ZNS verantwortlich. Es ist bereits bekannt, dass sie nicht nur bei der Kontrolle der Reflexe aus dem GIT, sondern auch bei der Entstehung von diversen pathologischen Zuständen (Dyspepsie, gastroösophagealer Reflux, Nausea, Erbrechen und viszeraler Schmerz) eine Rolle spielen. Nach neuen Erkenntnissen dienen die Afferenzen des N. vagus aber auch der Weiterleitung von Sättigungs- oder Hungersignalen zum ZNS und sind deswegen, für die Regulation der Nahrungsaufnahme, des Energiehaushalts und somit auch der Körpertemperatur von großer Bedeutung (127).

An der Transduktion dieser Signale beteiligen sich eine Vielfalt von Rezeptoren, die auf den Endigungen der viszeroafferente Fasern, im Bereich der Mucosa des GIT lokalisiert sind. Bei denen handelt es sich um Mechanorezeptoren und Chemorezeptoren. Mechanorezeptoren reagieren hauptsächlich auf Reize wie Dehnung oder Spannung, während Chemorezeptoren sensibel gegenüber Substanzen wie Nährstoffe, CCK, Serotonin, GABA, Opioide, Ghrelin und Leptin sind und das therapeutische Ziel vieler

Medikamenten bilden (3). Chemorezeptoren sind aber nicht nur in der Wand des GIT zu finden, sondern auch im sogenannten hepatoportalen System. Diese werden durch einen niedrigen Blutglucosespiegel, oder durch die verminderte Anwesenheit von absorbierten Nährstoffen in der V. porta aktiviert.

Ursprungsort der Sättigungssignale ist, wie bereits erwähnt der Gastrointestinaltrakt (GIT). Die Induktion von Hungersignalen findet dagegen hauptsächlich im hepatoportalen System statt. Aus diesem Grund wirken die viszeroafferenten Fasern, die aus dem GIT stammen stimulierend auf die Ncll. tractus solitarii, während die Fasern aus dem hepatoportalen System eher eine inhibitorische Wirkung aufweisen und entsprechend zur gesteigerten Nahrungsaufnahme führen. Die Aktivität beider Fasergruppen ist in einem Gleichgewicht, das der Regulation des Energiehaushalts dient (127). Genauso hat der N. vagus die Fähigkeit, zwei gleichzeitig auftretende Sättigungssignale zu verarbeiten und aus beiden eine sinnvolle Information zu formen (115).

4.2.4.1 Der Einfluss des N. Vagus auf die Ghrelinsekretion in vivo und in vitro

Wie bereits erwähnt, lässt allein die Anwesenheit cholinergischer Nervenendigungen des N. vagus in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Magendrüsen, dem Hauptort der Ghrelin-produzierenden Zellen einen regulativen Einfluss des Nerven aus anatomischer Sicht auf die Ghrelinsekretion möglich erscheinen. Date et al. berichteten als erste, daß die biologischen Wirkungen des Ghrelins auf die Nahrungsaufnahme über vagale Efferenzen vermittelt werden können (28). Diese These unterstützten Lee et al., die gezeigt haben, dass eine Vagotomie im Bereich des Truncus nach 2 Wochen einen um das dreifache erhöhten Ghrelinplasmaspiegel bewirkt. Dies führt zu der Vermutung, dass die Ghrelinsekretion unter tonischer Vagusinhibition steht (81). Auf der anderen Seite hat, wie von Muramaki et al. gezeigt wurde, die zervikale Vagusstimulation keine Wirkung auf die Ghrelinausschüttung bei narkotisierten Ratten (96). Auch beim

Menschen hat die vagale Aktivierung in Form von Scheinmahlzeiten („sham feeding“) keinen messbaren, kurzfristigen Einfluss auf die Ghrelinkonzentration im Plasma (40).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der obengenannten Studien führt die elektrische Reizung des N. Vagus beim isolierten Rattenmagen zu einer Stimulation der Ghrelinsekretion (84). Diese ist weitgehend unabhängig von der applizierten Frequenz und dem intraluminalen pH-Wert. Ein ähnliches Ergebnis lieferte auch die Studie von Williams et al., die gezeigt haben, dass die subdiaphragmale Vagotomie in vivo einen Anstieg des Ghrelins bei hungrigen Ratten verhindert. (146). Die zuvor, auf der Grundlage von anderen in vivo Versuchen beschriebene, tonisch-inhibitorische Funktion des N. Vagus ist insofern wahrscheinlich Ausdruck komplexer Regulationsprozessen unter Einbeziehung von extragastralen Einflüssen, die im isolierten Organmodell weitgehend ausgeschaltet sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die stimulierende Wirkung der elektrischen Reizung des N. vagus auf die Ghrelinsekretion des isolierten Rattenmagens erneut durch eine weitere Versuchsreihe bestätigt. Da die basale Ghrelinsekretion in dem verwendeten Versuchsmodell relativ niedrig war, wurde zur besseren Demonstration möglicher, inhibitorischer oder stimulierender Effekte der verschiedenen applizierten Hormone auch in den anderen Versuchsreihen eine vagale Vorstimulation durchgeführt.

5. Zusammenfassung

Ghrelin ist ein, aus 28 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon, das 1999 entdeckt wurde und vor allem im Magen gebildet und sezerniert wird. Die exogene Applikation von Ghrelin stimuliert den Appetit und die Nahrungsaufnahme bei verschiedenen Spezies einschließlich des Menschen. Der Ghrelinplasmaspiegel ist bei Hunger und Hypoglykämie erhöht und fällt unter der Zufuhr von kohlenhydratreichen Mahlzeiten ab. Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass die Ghrelinsekretion nicht nur von der Nahrungsaufnahme abhängig ist, sondern auch vom Energiezustand und dem Körpergewicht des Organismus. Basale Ghrelinplasmaspiegel sind bei Tumorkachexie und Anorexia nervosa erhöht, während Adipositas mit niedrigen Ghrelinspiegeln assoziiert ist. Veränderungen des Körpergewichts führen zu inversen Veränderungen des Ghrelinplasmaspiegels.

Eine Möglichkeit der Erklärung für die erniedrigten Ghrelinspiegel bei Adipositas könnte ein direkter Effekt von Adipozyten-sekretionsprodukten sein. Ein solches Sekretionsprodukt ist das Hormon Leptin. In der vorliegenden Arbeit konnte ein direkter, hemmender Effekt von Leptin auf die vagal vorstimulierte Ghrelinfreisetzung des Magens *in vitro*, über eine weite Konzentrationsspanne gezeigt werden.

Die erhöhten Insulinspiegel könnten eine zweite Erklärung für die reduzierten Ghrelinspiegel bei Adipositas darstellen. Es ist bereits bekannt, dass Insulin ein potenter Inhibitor der Ghrelinfreisetzung *in vivo* und *in vitro* ist. Die kombinierte Applikation von Leptin und Insulin in jeweils für die Ghrelinfreisetzung unwirksamen Konzentrationen zeigte auf die vagal vorstimulierte Ghrelinfreisetzung *in vitro* keinerlei Effekte. Daraus resultiert, dass Leptin und Insulin keine potenzierende Hemmung auf die Ghrelinsekretion ausüben.

Orexin A und B sind orexigene Neuropeptide, die hauptsächlich im lateralen Hypothalamus aber auch in der Peripherie synthetisiert werden. Die Applikation von Orexin A oder Orexin B in verschiedenen Konzentrationen zeigte keinerlei signifikante Effekte auf die vagal vorstimulierte Ghrelinsekretion des Rattenmagens *in vitro*. Auch die Gabe von einem Orexin-Antagonisten in verschiedenen Konzentrationen zeigte

sowohl auf die vagal vorstimulierte, als auch auf die basale Ghrelinfreisetzung keinerlei Wirkungen. Insofern scheint zumindest in vitro eine periphere, direkte Interaktion zwischen Orexinen und Ghrelin unbedeutend zu sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Adam J.A., Menheere P.P., van Dielen F.M., Soeters P.B., Buurman W.A., Greve J.W.: Decreased plasma orexin-A levels in obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26 (2002) 274-276
2. Ahima R.S., Osei S.Y.: Leptin signaling. *Physiol Behav* 81 (2004) 223-241
3. Andrews P.L., Sanger G.J.: Abdominal vagal afferent neurones: an important target for the treatment of gastrointestinal dysfunction. *Curr Opin Pharmacol.* 2 (2002) 650-656
4. Ariyasu H., Takaya K., Hosoda H., Iwakura H., Ebihara K., Mori K., Ogawa Y., Hosoda K., Akamizu T., Kojima M., Kangawa K., Nakao K.: Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the active form of ghrelin. *Endocrinology* 143 (2002) 3341-3350
5. Asakawa A., Inui A., Kaga T., Katsuura G., Fujimiya M., Fujino M.A., Kasuga M.: Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 52 (2003) 947-952
6. Asakawa A., Inui A., Kaga T., Yuzuriha H., Nagata T., Ueno N., Makino S., Fujimiya M., Niiijima A., Fujino M.A., Kasuga M.: Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 120 (2001) 337-345
7. Barazzoni R., Zanetti M., Stebel M., Biolo G., Cattin L., Guarnieri G.: Hyperleptinemia prevents increased plasma ghrelin concentration during short-term moderate caloric restriction in rats. *Gastroenterology* 124 (2003) 1188-1192
8. Bado A., Lévassieur S., Attoub S., Kermorgant S., Laigneau J.P., Bortoluzzi M.N., Moizo L., Lehy T., Guerre-Millo M., Le Marchand-Brustel Y., Lewin M.J.: The stomach is a source of leptin. *Nature* 394 (1998) 790-793
9. Baskin D.G., Figlewicz Lattemann D., Seeley R.J., Woods S.C., Porte D. Jr, Schwartz M.W.: Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res* 848 (1999) 114-123.
10. Bercu B.B., Yang S.W., Masuda R., Walker R.F.: Role of selected endogenous peptides in growth hormone-releasing hexapeptide activity: Analysis of growth hormone-releasing hormone, thyroid hormone-releasing hormone and gonadotropin releasing hormone. *Endocrinology* 130 (1992) 2579-2586
11. Beretta E., Dube M.G., Kalra P.S., Kalra S.P.: Long-term suppression of weight gain, adiposity and serum insulin by central leptin gene therapy in prepubertal rats: effects on serum ghrelin and appetite-regulating genes. *Pediatr Res* 52 (2002) 189-198
12. Bjorbaek C., Elmquist J.K., Frantz J.D., Shoelson S.E., Flier J.S.: Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* 1 (1998a) 619-625
13. Bjorbaek C., Elmquist J.K., Michl P.: Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 139 (1998b) 3485-3491
14. Bjorbaek C., Kahn B.B.: Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res.* 59 (2004) 305-331
15. Bowers C.Y., Momany F.A., Reynolds G.A., Hong A.: 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 (1984) 1537-1545

16. Broglio F., Arvat E., Benso A., Gottero C., Muccioli G., Papotti M., Van der Lely A.J., Deghenghi R., Ghigo E.: Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001) 5083-5086
17. Buyse M., Ovesjo M.L., Goiot H., Guilmeau S., Peranzi G., Moizo L., Walker F., Lewin M.J., Meister B., Bado A.: Expression and regulation of leptin receptor proteins in afferent and efferent neurons of the vagus nerve. *Eur J Neurosci* 14 (2001) 64-72
18. Caixas A., Bashore C., Nash W., Pi-Sunyer F., Laferrere B.: Insulin unlike food intake does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002) 1902
19. Cammisotto P.G., Renaud C., Gingras D., Delvin E., Levy E., Bendayan M.: Endocrine and exocrine secretion of leptin by the gastric mucosa. *J Histochem Cytochem* 53 (2005) 851-860
20. Casanueva F., Dieguez C.: Ghrelin: The link connecting growth with metabolism and energy homeostasis. *Rev Endocr Metab Disord* 3 (2002) 325-338
21. Chan J.L., Bullen J., Lee J.H., Yiannakouris N., Mantzoros C.S.: Ghrelin levels are not regulated by recombinant leptin administration and/or three days of fasting in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 89 (2004) 335-343
22. Charsoulis F.: The regulation of food intake in central nervous system. *Griechische Medizin* 68 (2002) 17-26.
23. Cinti S., Matteis R.D., Pico C., Ceresi E., Obrador A., Maffei C., Oliver J., Palou A.: Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 (2000) 789-793
24. Cowley M.A., Smith R.G., Diano S., Tschöp M., Pronchuk N., Grove K.L., Strasburger C.J., Bidlingmaier M., Esterman M., Heiman M.L., Garcia-Segura L.M., Nillni E.A., Mendez P., Low M.J., Sotonyi P., Friedman J.M., Liu H., Pinto S., Colmers W.F., Cone R.D., Horvath T.L.: The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37 (2003) 649-661
25. Cummings D.E., Purnell J.Q., Frayo R.S., Schmidova K., Wisse B.E., Weigle D.S.: a preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50 (2001) 1714-1719
26. Cuntz U., Fruhauf E., Wawarta R., Tschöp M., Folwaczny C., Riepl R., Lehnert P., Fichter M., Otto B.: A role for the novel weight-regulating hormone ghrelin in anorexia nervosa. *Am Clin Lab* 21 (2002) 22-23
27. Date Y., Kojima M., Hosoda H., Sawaguchi A., Mondal M.S., Suganuma T., Matsukura S., Kangawa K., Nakazato M.: 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 (2000) 4255-4261
28. Date Y., Murakami N., Toshinai K., Matsukura S., Nijima A., Matsuo H., Kangawa A., Nakatsato E.: The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123 (2002a) 1120-1128
29. Date Y., Nakazato M., Hashiguchi S., Dezaki K., Mondal M.S., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K., Arima T., Matsuo H., Yada T., Matsukura S.: Ghrelin is present in pancreatic a-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51 (2002b) 124-129

30. Date Y., Nakazato M., Murakami N., Kojima M., Kangawa K., Matsukura S.: Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 280 (2001) 904-907
31. de Lecea L., Kilduff T.S., Peyron C., Gao X.-B., Foye P.E., Danielson P.E., Fukuhara C., Battenberg E.L., Gautvik V.T., Bartlett F.S., Frankel W.N., van den Pol A.N., Bloom F.E., Gautvik K.M., Sutcliffe J.G.: The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 322-327
32. Del Parigi A., Tschöp M., Heiman M.L., Salbe A.D., Vozarova B., Sell S.M., Bunt J.C., Tataranni P.A.: High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in Prader-Willi-syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002) 5461-5464
33. Dourish C.T.: New frontiers in obesity research. *Neurosci News* 2 (1999) 4
34. Draghia-Akli R., Hahn K.A., King G.K., Cummings K.K., Carpenter R.H.: Effects of plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone in severely debilitated dogs with cancer. *Mol Ther* 6 (2002) 830-836
35. Dube M.G., Beretta E., Dhillon H., Ueno N., Kalra P.S., Kalra S.P.: Central leptin gene therapy blocks high-fat diet-induced weight gain, hyperleptinemia and hyperinsulinemia: increase in serum ghrelin levels. *Diabetes* 51 (2002) 1729-1736
36. Dube M.G., Kalra S.P., Kalra P.S.: Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. *Brain Res* 842 (1999) 473-477
37. Ehrstrom M., Gustafsson T., Finn A., Kirchgessner A., Gryback P., Jacobsson H., Hellstrom P.M., Naslund E.: Inhibitory effect of exogenous orexin-A on gastric emptying, plasma leptin, and the distribution of orexin and orexin receptors in the gut and pancreas in man. *J Clin Endocrinol Metab* 90 (2005a) 2370-2377
38. Ehrstrom M., Levin F., Kirchgessner A.L., Schmidt P.T., Hilsted L.M., Gryback P., Jacobsson H., Hellstrom P.M., Naslund E.: Stimulatory effect of endogenous orexin A on gastric emptying and acid secretion independent of gastrin. *Regul Pept* 132 (2005b) 9-16
39. English P.J., Ghatei M.A., Malik I.A., Bloom S.R., Wilding J.P.: Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002) 2984-2987
40. Erdmann J., Lippl F., Schusdziarra V.: Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regul Pept* 116 (2003) 101-107
41. Erdmann J., Lippl F., Wagenpfeil S., Schusdziarra V.: Differential association of basal and postprandial plasma ghrelin with leptin, insulin and type 2 diabetes. *Diabetes* 54 (2005) 1371-1378
42. Farooqi I.S., Jebb S.A., Langmack G., Lawrence E., Cheetham C.H., Prentice A.M., Hughes I.A., McCamish M.A., O'Rahilly S.: Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 341 (1999) 879-884
43. Flanagan D.E., Evans M.L., Monsod T.P., Rife F., Heptulla R.A., Tamborlane W.V., Sherwin R.S.: The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284 (2003) 13-16
44. Funahashi H., Hori T., Shimoda Y., Mizushima H., Ryushi T., Katoh S., Shioda S.: Morphological evidence for neural interactions between leptin and orexin in the hypothalamus. *Regul pept* 92 (2000) 31-35
45. Geliebter A., Westreich S., Gage D.: Gastric distension by balloon and test-meal intake in obese and lean subjects. *Am J Clin Nutr* 48 (1988) 592-594
46. Gnanapavan S., Kola B., Bustin S.A., Morris D.G., McGee P., Fairclough P., Bhattacharya S., Carpenter R., Grossman A.B., Korbonits M.: The tissue distribution of

the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002) 2988

47. Gorden P., Gavrilova O.: The clinical uses of leptin. *Curr Opin Pharmacol* 3 (2003) 655-659

48. Grinspoon S., Gulick T., Askari H., Landt M., Lee K., Anderson E., Ma Z., Vignati L., Bowsher R., Herzog D., Klibanski A.: Serum leptin levels in women with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (1996) 3861-3863

49. Gualillo O., Caminos J., Blanco M., Garcia-Caballero T., Kojima M., Kangawa K., Dieguez C., Casanueva F.: Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 142 (2001) 788-794

50. Häkansson M.L., Brown H., Ghilardi N., Skoda R.C., Meister B.: Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci* 18 (1998) 559-572

51. Hansen T.K., Dall R., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K., Christiansen J.S., Jorgensen J.O.: Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol* 56 (2002) 203-206

52. Hattori N., Saito T., Yagyu T., Jiang B.H., Kitagawa K., Inagaki C.: GH, GH-receptor, GH Secretagogue receptor and ghrelin expression in human t cells, b cells and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001) 4284-4291

53. Havel P.J.: Glucose, but not fructose, infusion increases circulating leptin in proportion to adipose stores in rhesus monkeys. *Exp Clin Endocrinol Metab* 105 (1997) 37-38

54. Havel P.J., Kasim-Karakas S., Dubuc G.R., Mueller W., Phinney S.D.: Gender differences in plasma leptin concentrations. *Nat Med* 2 (1996) 949-950

55. Havel P.J.: Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med* 226 (2001) 963-977

56. Haynes A.C., Chapman H., Taylor C., Moore G.B.T., Cawthorne M.A., Clapham J.C., Arch J.R.S.: Anorectic, thermogenic and anti-obesity activity of a selective orexin-1 receptor antagonist in ob/ob mice. *Regul Pept* 104 (2002) 153-159

57. Haynes A.C., Jackson B., Chapman H., Tadayyon M., Johns A., Porter R.A., Arch J.R.S.: A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regul Pept* 96 (2000) 46-51

58. Haynes A.C., Jackson B., Overend P., Buckingham R.E., Wilson S., Tadayyon M., Arch J.R.S.: Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 20 (1999) 1099-1105

59. Hetherington A.W., Ranson S.W.: Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec* 78 (1940) 149-172

60. Heymsfield S.B., Greenberg A.S., Fujioka K., Dixon R.M., Kushner R., Hunt T., Lubina J.A., Patane J., Self B., Hunt P., McCamish M.: Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *J Am Med Assoc* 282 (1999) 1568-1575

61. Holst B., Cygankiewicz A., Jensen T.H., Ankersen M., Schwartz T.W.: High constitutive signaling of the ghrelin receptor-identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol* 17 (2003) 2201-2210

62. Horvath T.L., Diano S., Sotonyi P., Heiman M.L., Tschöp M.: Ghrelin and the regulation of energy homeostasis: a hypothalamic perspective. *Endocrinology* 142 (2001) 4163-4169
63. Horvath T.L., Diano S., van den Pol A.N.: Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci* 19 (1999) 1072-1087
64. Hosoda H., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K.: Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 279 (2000) 909-913
65. Howard H.D., Feighner S.D., Cully D.F., Arena J.P., Liberatore P.A., Rosenblum C.I., Hamelin M., Hreniuk D.L., Palyha O.C., Anderson J., Paress P.S., Diaz C., Chou M., Liu K.K., McKee K.K., Pong S.S., Chaung L.Y., Elbrecht A., Dashkevich M., Heavens R., Rigby M., Sirinathsinghji D.J., Dean D.C., Melillo D.G., Patchett A.A., Nargund R., Griffin P.R., DeMartino J.A., Gupta S.K., Schaeffer J.M., Smith R.G., Van der Ploeg L.H.: A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273 (1996) 974-976
66. Inui A.: Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA Cancer J Clin* 52 (2002) 72-91
67. Jin L., Zhang S., Burguera B.G., Couce M.E., Osamura R.Y., Kulig E., Lloyd R.V.: Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology* 141 (2000) 333-339
68. Kaiya H., Kojima M., Hosoda H., Koda A., Yamamoto K., Kitajima Y., Matsumoto M., Minamitake Y., Kikuyama S., Kangawa K.: Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue. *J Biol Chem* 276 (2001) 40441-40448
69. Kalra S.P., Dube M.G., Pu S., Xu B., Horvath T.L., Kalra P.S.: Interacting appetite regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine reviews* 20 (1999) 68-100
70. Kamegai J., Tamura H., Shimizu S., Ishii S., Sugihara h., Oikawa S.: effects of insulin, leptin and glucagon on ghrelin secretion from isolated perfused rat stomach. *Regul Pept* 119 (2004) 77-81
71. Kennedy A.G.: The role of the fat depot in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc Roy Soc Lond B Biol Sci* 140 (1953) 578-592
72. Kirchgessner A.L., Liu M.-T.: Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* 24 (1999) 941-951
73. Kirchgessner A.L.: Orexins in the brain-gut axis. *Endocr Rev* 23 (2002) 1-15
74. Kobashi M., Furudono Y., Matsuo R., Yamamoto T.: Central orexin facilitates gastric relaxation and contractility in rats. *Neurosci Lett* 332 (2002) 171-174
75. Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K.: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402 (1999) 656-660
76. Kolaczynski J.W., Ohannesian J.P., Considine R.V., Marco C.C., Caro J.F.: Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (1996) 4162-4165
77. Konturek P.C., Konturek S.J., Brzozowski T., Jaworek J., Hahn E.G.: Role of leptin in the stomach and the pancreas. *J Physiol Paris* 95 (2001) 345-354
78. Korbonits M., Gueorguiev M., O'Grady E., Lecoecur C., Swan D.C., Mein C.A., Weill J., Grossman A.B., Froguel P.: A variation in the ghrelin gene increases weight and

- decreases insulin secretion in tall, obese children. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002) 4005-4008
- 79.** Korczynski W., Ceregrzyn M., Matyjek R., Kato I., Kuwahara A., Wolinski J., Zabielski R.: Central and local (enteric) action of orexins. *J Physiol Pharmacol* 57 (2006) 17-42
- 80.** Krsek M., Rosicka M., Haluzik M., Svobodova J., Kotrlikova E., Justova V., Lacinova Z., Jarkovska Z.: Plasma ghrelin levels in patients with short bowel syndrome. *Endocr Res* 28 (2002) 27-33
- 81.** Lee H.M., Wang G., Englander E.W., Kojima M., Greeley Jr G.H.: Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine and dietary manipulations. *Endocrinology* 143 (2002) 185-190
- 82.** Levin F., Edholm T., Ehrstrom M., Wallin B., Schmidt P.T., Kirchgessner A.M., Hilsted L.M., Hellstrom P.M., Naslund E.: Effect of peripherally administered ghrelin on gastric emptying and acid secretion in the rat. *Regul Pept* 131 (2005) 59-65
- 83.** Lippl F., Erdmann J., Atmatzidis S., Schusdziarra V.: Direct effect of leptin on gastric ghrelin secretion. *Horm Metab Res* 37 (2005) 123-125
- 84.** Lippl F., Kirchner F., Erdmann J., Allescher H. D., Schusdziarra V.: Effect of GIP, GLP-1, insulin and gastrin on ghrelin release in the isolated rat stomach. *Regul Pept* 119 (2004) 93 -98
- 85.** Lissner L., Levitsky D.A., Strupp B.J., Kackwarf H., Roe D.A.: Dietary fat and the regulation of energy intake in human subjects. *Am J Clin Nutr* 46 (1987) 886-892
- 86.** Masaoka T., Suzuki H., Hosoda H., Ota T., Minegishi J., Nagata H., Kangawa K., Ishii H.: Enhanced plasma ghrelin levels in rats with streptozotocin-induced diabetes. *FEBS Lett* 541 (2003) 64-68
- 87.** Masuda Y., Tanaka T., Inomata N., Ohnuma N., Tanaka S., Itoh Z., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K.: Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 276 (2000) 905-908
- 88.** Masuzaki H., Ogawa Y., Sagawa N., Hosoda K., Matsumoto T., Mise H., Nishimura H., Yoshimasa Y., Tanaka I., Mori T., Nakao K.: Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3 (1997) 1029-1033
- 89.** McKee K.K., Tan C.P., Palyha O.C., Liu J., Feighner S.D., Hreniuk D.L., Smith R.G., Howard A.D., Van der Ploeg L.H.: Cloning and characterization of two human G-protein-coupled receptor genes (GPR 38 and GPR 39) related to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors. *Genomics* 46 (1997) 426-434
- 90.** Merchenthaler I.: Neurons with access to the general circulation in the central nervous system of the rat: retrograde tracing study with fluoro-gold. *Neuroscience* 44 (1991) 655-662
- 91.** Möhlig M., Spranger J., Otto B., Ristow M., Tschöp M., Pfeiffer A.F.H.: Euglycemic hyperinsulinemia, but not lipid infusion, decreases circulating ghrelin levels in humans. *J. endocrinol. Invest.* 25 (2002) 36-38
- 92.** Montague C.T., Farooqi I.S., Whitehead J.P., Soos M.A., Rau H., Wareham N.J., Sewter C.P., Digby J.E., Mohammed S.N., Hurst J.A., Cheetham C.H., Earley A.R., Barnett A.H., Prins J.B., O'Rahilly S.: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387 (1997) 903-908
- 93.** Moore R.Y., Speh J.C., van den Pol A.N.: Hypocretin localization in the human hypothalamus. *Soc Neurosci Abstr* 24 (1998) 762.1.

94. Mori K., Yoshimoto A., Takaya K., Hosoda K., Ariyasu H., Yahata K., Mukoyama M., Sugawara A., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K., Nakao K.: Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett* 486 (2000) 213-216
95. Muccioli G., Tschöp M., Papotti M., Deghenghi R., Heiman M., Ghigo E.: Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol* 440 (2002) 235-254
96. Murakami N., Hayashida T., Kuroiwa T., Nakahara K., Ida T., Mondal M.S., Nakazato M., Kojima M., Kangawa K.: Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. *J Endocrinol* 174 (2002) 283-288
97. Nakabayashi M., Suzuki T., Takahashi K., Totsune K., Muramatsu Y., Kaneko C., Date F., Takeyama J., Darnel A.D., Moriya T., Sasano H.: Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol Cell Endocrinol* 205 (2003) 43-50
98. Nedvidkova J., Kryorkova I., Bartak V., Papezova H., Gold P.W., Alesci S., Pacak K.: Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (2003) 1678-1682
99. Nowak K.W., Mackowiak P., Switonska M.M., Fabis M., Malendowicz L.K.: Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Life Sci* 66 (2000) 449-454
100. Otto B., Cuntz U., Fruehauf E., Wawarta R., Folwaczny C., Riepl R.L., Heiman M.L., Lehnert P., Fichter M., Tschöp M.: Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 145 (2001) 669-673
101. Ouedraogo R., Naslund E., Kirchgessner A.L.: Glucose regulates the release of orexin-A from the endocrine pancreas. *Diabetes* 52 (2003) 111-117
102. Palou A., Serra F., Bonet M.L., Pico C.: Obesity: molecular bases of a multifactorial problem. *Eur J Nutr* 39 (2000) 127-144
103. Pico C., Oliver P., Sanchez J., Palou A.: Gastric leptin: a putative role in the short-term regulation of food intake. *Br J Nutr.* 90 (2003) 735-741
104. Polonsky K.S., Given E., Carter V.: Twenty four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 81 (1988) 442
105. Rodgers R.J., Halford J.C.G., Nunes de Souza R.L., Canto de Souza A.L., Piper D.C., Arch J.R.S., Upton N., Porter R.A., Johns A., Blundell J.E.: SB-334867, aselective orexin-1 receptor antagonist, enhances behavioural satiety and blocks the hyperphagic effect of orexin-A in rats. *Eur J Neurosci* 13 (2001) 1444-1452
106. Rodgers R.J., Ishii Y., Halford J.C.G., Blundell J.E.: Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides* 36 (2002) 303-325
107. Rosicka M., Krsek M., Matoulek M., Jarkovska Z., Marek J., Justova V., Lacinova C.: Serum ghrelin levels in obese patients: the relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels. *Physiol. Res.* 52 (2003) 61-66
108. Saad M.F., Khan A., Sharma A., Michael R., Riad-Gabriel M.G., Boyadjian R., Jinagouda S.D., Steil G.M., Kamdar V.: Physiological insulinemia acutely modulates plasma leptin. *Diabetes* 47 (1998) 544-549
109. Sahu A.: Leptin decreases food intake induced by galanin, melanin concentrating hormone and neuropeptide Y in the rat. Program of the 80th Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans, LA 253 (1998) 439
110. Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R.M., Tanaka H., Williams S.C., Richardson J.A., Kozlowski G.P., Wilson S., Arch J.R.S., Buckingham R.E., Haynes A.C., Carr S.A., Annan R.S., McNulty D.E., Liu W.-S., Terrett J.A.,

Elshourbagy N.A., Bergsma D.J., Yanagisawa M.: orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G-protein coupled receptors that regulate feeding. *Cell* 92 (1998) 573-585

111. Sakurai T., Moriguchi T., Furuya K., Kajiwara N., Nakamura T., Yanagisawa M., Goto K.: structure and function of human prepro-orexin gene. *J Biol Chem* 274 (1999) 17771-17776

112. Schaller G., Schmidt A., Pleiner J., Woloszczuk W., Wolzt M., Luger A.: Plasma ghrelin concentrations are not regulated by glucose or insulin: a double-blind, placebo-controlled, crossover clamp study. *Diabetes* 52 (2003) 16-20

113. Schick R.R., Schusdziarra V.: Regulation of food intake. In: Ditschuneit H., Gries F.A., Hauner H., Schusdziarra V., Wechsler J.G., ed. *Obesity in Europe* (1993) London: John Libbey 335-348

114. Schoeller D.A., Cella L.K., Sinha M.K., Caro J.F.: Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. *J Clin Invest* 100 (1997) 1882-1887

115. Schwartz G.J., PhD: The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition* 16 (2000), 866-873

116. Schwartz M.W., Peskind E., Raskind M., Boyko E.J., Porte D.: Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med* 2 (1996) 589-593

117. Shimizu Y., Nagaya N., Isobe T., Imazu M., Okumura H., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K., Kohno N.: increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res* 9 (2003) 774-778

118. Sindelar D.K., Havel P.J., Seeley R.J., Wilkinson C.W., Woods S.C., Schwartz M.W.: Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. *Diabetes* 48 (1999) 1275-1280

119. Sinha M.K., Sturis J., Ohannesian J., Magosin S., Stephens T., Heiman M.L., Polonsky K.S., Caro J.F.: Ultradian oscillations of leptin secretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 228 (1996) 733-738

120. Small C.J., Stanley S.A., Bloom S.R.: Appetite control and reproduction: Leptin and beyond. *Semin Reprod Med* 20 (2002) 389-398

121. Smart D., Sabido-David C., Brough S.J., Jewitt F., Johns A., Porter R.A., Jerman J.C.: SB-334867-A: the first selective orexin-1 receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 132 (2001) 1179-1182

122. Smith R.G., Palyha O.C., Feighner S.D., Tan C.P., McKee K.K., Hreniuk D.L., Yang L., Morriello G., Nargund R., Patchett A.A., Howard A.D.: Growth hormone releasing substances: types and their receptors. *Horm Res* 51 (1999) 1-8

123. Smith S.L., Fraser D.C., Needham A.M., Jackson H.C., Cheetham S.C., Heal D.J.: Effect of central injection of anti-orexin1 receptor antibody on food intake in rats. *Int j Obesity* 24 (2000) S37, 102

124. Sobhani I., Bado A., Vissuzaine C., Buyse M., Kermorgant S., Laigneau J.P., Attoub S., Lehy T., Henin D., Mignon M., Lewin M.J.: Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut* 47 (2000) 178-183

125. Spiegelman B.M., Flier J.S.: Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104 (2001) 531-543

126. Stubbs R.J., Van Wyck M., Johnson A.M., Harbron C.G.: Breakfast high in protein, fat or carbohydrate: effect on within-day appetite and energy balance. *Eur J Clin Nutr* 50 (1996) 409-417

127. Szekely M.: The vagus nerve in thermoregulation and energy metabolism. *Auton Neurosci* 85 (2000) 26-38
128. Takahashi N., Okumura T., Yamada H., Kohogo Y.: Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats. *Biochem Biophys Res Commun* 254 (1999) 623-627
129. Takano S., Kanai S., Hosoya H., Ohta M., Uematsu H., Miyasaka K.: Orexin-A does not stimulate food intake in old rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287 (2004) G1182-1187
130. Tanaka M., Naruo T., Muranaga T., Yasuhara D., Shiiya T., Nakazato M., Matsukura S., Nozoe S.: Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa. *Eur J Endocrinol* 146 (2002) R1-R3
131. Tartaglia L.A., Dembski M., Weng X., Deng N., Culpepper J., Devos R., Richards G.J., Campfield L.A., Clark F.T., Deeds J., Muir C., Sanker S., Moriarty A., Moore K.J., Smutko J.S., Mays G.G., Wool E.A., Monroe C.A., Tepper R.I.: Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83 (1995) 1263-1271
132. Toshinai K., Date Y., Murakami N., Shimada M., Mondal M.S., Shimbara T., Guan J.-L., Wang Q.-P., Funahashi H., Sakurai T., Shioda S., Matsukura S., Kangawa K., Nakazato M.: Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 144 (2003) 1506-1512
133. Toshinai K., Mondal M.S., Nakazato M., Date Y., Murakami N., Kojima M., Kangawa K., Matsukura S.: Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun* 281 (2001) 1220-1225
134. Trudel L., Tomasetto C., Rio M.C., Bouin M., Plourde V., Eberling P., Poitras P.: Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol* 282 (2002) G948-G952
135. Tschöp M., Smiley D.L., Heiman M.L.: Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407 (2000) 908-913
136. Tschöp M., Wawarta R., Riepl R.L., Friedrich S., Bidlingmaier M., Landgraf R., Folwaczny C.: post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol invest* 24 (2001a) RC 19-RC21
137. Tschöp M., Weyer C., Tataranni P.A., Devanarayan V., Ravussin E., Heiman M.L.: Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50 (2001b) 707-709
138. Ukkola O., Ravussin E., Jacobson P., Perusse L., Rankinen T., Tschöp M., Heiman M.L., Leon A.S., Rao D.C., Skinner J.S., Wilmore J.H., Sjostrom L., Bouchard C.: Role of ghrelin polymorphisms in obesity based on three different studies. *Obes Res* 10 (2002) 782-791
139. Utriainen T., Malmstrom R., Makimattila S., Yki-Jarvinen H.: Supraphysiological hyperinsulinemia increases plasma leptin concentrations after 4 h in normal subjects. *Diabetes* 45 (1996) 1364-1366
140. van den Pol A.N., Gao X.B., Obrietan K., Kilduff T.S., Belousov A.B.: Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J Neurosci* 18 (1998) 7962-7971
141. van der Lely A.J., Tschöp M., Heiman M.L., Ghigo E.: Biological, physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 25 (2004) 426-457

142. Van Stratum P., Lussenburg R.N., van Wezel L.A., Vergroesen A.J., Cremer H.D.: The effect of dietary carbohydrate: fat ratio on energy intake by adult women. *Am J Clin Nutr* 31 (1978) 206-212
143. Volante M., Allia E., Gugliotta P., Funaro A., Broglio F., Deghenghi R., Muccioli G., Ghigo E., Papotti M.: Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002) 1300-1308
144. Wajnrajch M.P., Ten I.S., Gertner J.M., Leibel R.L.: Genomic organization of human ghrelin gene. *J Endocrinol Genet* 1 (2000) 231-233
145. Wang J., Liu R., Hawkins M., Barzilai N., Rossetti L.: A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393 (1998) 684-688
146. Williams D.L., Grill H.J., Cummings D.E., Kaplan J.E.: Vagotomy dissociates short-and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology* 144 (2003) 5184-5187
147. Wisse B.E., Frayo R.S., Schwartz M.W., Cummings D.E.: Reversal of cancer anorexia by blockade of central melanocortin receptors in rats. *Endocrinology* 142 (2001) 3292-3301
148. Woods S.C., Decke E., Vasselli J.R.: Metabolic hormones and regulation of body weight. *Psychol Rev* 81 (1974) 26-43
149. Woods S.C.: Gastrointestinal satiety signals. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286 (2004) 7-13
150. Woods S.C., Seeley R.J.: Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition* 16 (2000) 894-902
151. Wren A.M., Seal L.J., Cohen M.A., Brynes A.E., Frost G.S., Murphy K.G., Dhillon W.S., Ghatei M.A., Bloom S.R.: Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001) 5992-5995
152. Wren A.M., Small C.J., Ward H.L., Murphy K.G., Dakin C.L., Taheri S., Kennedy A.R., Roberts G.H., Morgan D.G., Ghatei M.A., Bloom S.R.: The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141 (2000) 4325-4328
153. Wu J.T., Kral J.G.: Ghrelin, integrative neuroendocrine peptide in health and disease. *Ann Surg* 239 (2004) 464-474
154. Yamada H., Okumura T., Motomura W., Kobayashi Y., Kohgo Y.: Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 267 (2000) 527-531
155. Yamada H., Takahashi N., Tanno S., Nagamine M., Takakusaki K., Okumura T.: A selective orexin-1 receptor antagonist, SB334867, blocks 2-DG-induced gastric acid secretion in rats. *Neurosci Lett* 376 (2005) 137-142
156. Yamanaka A., Sakurai T., Katsumoto T., Yanagisawa M., Goto K.: Chronic intracerebroventricular administration of Orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Res* 849 (1999) 248-252
157. Zhang W., Chen M., Chen X., Segura B.J., Mulholland M.W.: Inhibition of pancreatic protein secretion by ghrelin in the rat. *J Physiol* 537 (2001) 231-236
158. Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372 (1994) 425-432

7. Danksagung

Herrn Professor Dr. V. Schusdziarra danke ich, dass er mir ermöglichte, die vorliegende Arbeit in seiner Forschungsgruppe durchzuführen. Sein kompetenter Rat beeinflusste den Werdegang entscheidend.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Florian Lippl für die ausgezeichnete fachliche Betreuung während der experimentellen Phase und bei der Auswertung der Ergebnisse. Er begleitete die wissenschaftliche Arbeit mit persönlichem Einsatz und zeigte große Hilfsbereitschaft.

Außerdem bedanke ich mich herzlich bei Frau Christine Herder für die Durchführung der Radioimmunoassays und für ihr persönliches Engagement, sowie bei Herrn Jens Zimmermann für seine Unterstützung bei der Labortätigkeit.

Schließlich danke ich all jenen, die auf unterschiedliche Art und Weise zum Gelingen der vorliegenden Dissertation beigetragen haben.