

**Else Kröner Fresenius Zentrum für Ernährungsmedizin  
der Technischen Universität München**

**Einfluss von  
Vagusstimulation, GIP, CCK und Glukose  
auf die Ghrelin-Sekretion aus dem isolierten  
Rattenmagen**

**Ewa Fröhlich**

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. J. J. Hauner

Die Dissertation wurde am 27.12.06 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.04.07 angenommen.

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b>                                                | 1  |
| Abkürzungsverzeichnis                                                    | 2  |
| 1. Einleitung                                                            | 3  |
| 2. Material und Methoden                                                 | 6  |
| 2.1 Versuchstiere                                                        | 6  |
| 2.2 Vagusstimulation                                                     | 6  |
| 2.3 In Vitro Versuche                                                    | 7  |
| 2.3.1 Präparationsbeschreibung                                           | 7  |
| 2.3.2 Versuchsprotokoll                                                  | 9  |
| 2.4 Versuchsauswertung                                                   | 12 |
| 2.4.1 Bestimmung der Ghrelinkonzentration im Perfusat                    | 12 |
| 2.4.2 Statistische Auswertung                                            | 12 |
| 3. Ergebnisse                                                            | 13 |
| 3.1. Vagusstimulation                                                    | 13 |
| 3.2 Effekt des GIP                                                       | 13 |
| 3.3 Effekt von CCK-8 und CCK-9                                           | 18 |
| 3.4 Effekt der Hyperglykämie auf die Ghrelinfreisetzung                  | 24 |
| 4. Allgemeine Diskussion                                                 | 25 |
| 5. Spezielle Diskussion                                                  | 31 |
| 5.1. Ghrelin                                                             | 31 |
| 5.1.2 Nervus Vagus und Ghrelin                                           | 32 |
| 5.2 Cholecystokinin in Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme und Ghrelin | 32 |
| 5.2.1. Struktur und Vorkommen des Cholecystokinins (CCK)                 | 32 |
| 5.2.2 Effekte des CCK                                                    | 33 |
| 5.2.3 CCK und Ghrelin                                                    | 33 |
| 5.3 Bedeutung des GIP                                                    | 34 |
| 5.3.1 Struktur                                                           | 34 |
| 5.3.2 Lokalisation und Ausschüttung                                      | 34 |
| 5.3.3 Biologische Wirkung                                                | 35 |
| 5.3.4 GIP und Ghrelin                                                    | 36 |
| 6. Zusammenfassung                                                       | 37 |
| 7. Literaturverzeichnis                                                  | 39 |
| 8. Danksagung                                                            | 46 |

## Abkürzungsverzeichnis

|        |                                      |
|--------|--------------------------------------|
| A.     | Arterie                              |
| Abb    | Abbildung                            |
| BMI    | Body mass index                      |
| ca.    | circa                                |
| CART   | Cocain/Amphetamin-related transcript |
| CCK    | Cholecystokinin                      |
| CCK-PZ | Cholecystokinin-Pancreozymin         |
| g      | Gramm                                |
| GHS-R  | Growth-hormone-secretagogue-Rezeptor |
| GIP    | Gastric Inhibitory Polypeptide       |
| GLP-1  | Glukagon-like Peptide 1              |
| Hz     | Hertz                                |
| I.E.   | internationale Einheit               |
| i.v.   | intra venös                          |
| kcal   | Kilokalorie                          |
| kg     | Kilogramm                            |
| l      | Liter                                |
| LH     | Lateraler Hypothalamus               |
| m      | Meter                                |
| M      | Molar                                |
| MCH    | Melanin Concentrating Hormon         |
| min    | Minuten                              |
| ml     | Milliliter                           |
| mm     | Millimeter                           |
| mMol   | Millimol                             |
| n      | Anzahl der Versuchstiere             |
| N.     | Nervus                               |
| p      | Wahrscheinlichkeit                   |
| pg     | Picogramm                            |
| PVN    | Paraventriculärer Nucleus            |
| RIA    | Radioimmunoassay                     |
| sec    | Sekunde                              |
| s.c.   | sub cutan                            |
| SEM    | Standard error of mean               |
| TRH    | Thyreotropin-Releasing- Hormon       |
| V      | Volt                                 |
| V.     | Vena                                 |
| VIP    | Vasoaktives intestinales Peptid      |
| VMH    | Nucleus ventromedialis hypothalami   |
| WHO    | World health Organisation            |
| z.B.   | zum Beispiel                         |
| ZNS    | Zentrales Nervensystem               |

# 1. Einleitung

Eines der schwerwiegendsten Probleme der Bevölkerung in den industrialisierten Ländern ist die Adipositas. Sie bezeichnet eine pathologische Vermehrung des Körperfettes und ist nicht nur mit einer vermehrten Morbidität sondern auch mit erhöhter Mortalität verbunden. Die WHO definiert die Adipositas nach dem Body-Mass- Index (BMI bedeutet Körpergewicht (kg) : Körpergröße zum Quadrat (m<sup>2</sup>)). Von Adipositas Grad 1 spricht man ab einem BMI von 30-34.5, von Grad 3 bei BMI-Werten ab 40.

Von der europäischen Bevölkerung sind 15- 20% adipös (BMI grösser 30).

Sie entsteht durch eine positive Energiebilanz, meistens bei übermässiger Nahrungsaufnahme (Kalorienzufuhr grösser als Kalorienverbrauch). Adipositas begünstigt viele weitere Erkrankungen, angefangen von Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2, orthopädischen Beschwerden, Hyperurikämie, Fettstoffwechselstörungen oder bis hin zu kardialen und respiratorischen pathologischen Veränderungen sowie bestimmten Karzinomen.

In früheren Zeiten war die Fähigkeit, Energie schnell zu speichern, ein Überlebensvorteil solange es nicht immer gewährleistet war, genügend Nahrung regelmässig zu sich zu nehmen. In den modernen Industriestaaten sind Hungerperioden jedoch selten geworden. Ausserdem hat sich der tägliche Kalorienverbrauch verringert. Die Menschen bewegen sich im Vergleich zu vor hundert Jahren weniger und die Arbeitstätigkeit findet in den Industriestaaten hauptsächlich im Sitzen statt.

So führt der Selektionsvorteil vergangener Zeiten heute schneller zur Adipositas und damit zu einem Selektionsnachteil durch oben genannte „Wohlstandskrankheiten“.

Somit ist die Erforschung der Regulation der Nahrungsaufnahme immer mehr in den Vordergrund gerückt. Nicht, um einem Verhungern vorzubeugen, sondern die unkontrollierte Nahrungsaufnahme zu bremsen.

Die Steuerung der Nahrungsaufnahme ist sehr komplex und wird über zentrale, vagale und hormonelle Regulationssysteme sowie appetitstimulierende (orektische) und -hemmende (anorektische)

Faktoren reguliert.

Die Energiezufuhr wird durch Hungergefühl und Sättigung gesteuert. Auf zentralnervöser Ebene nimmt der Hypothalamus die wichtigste Rolle ein. Die aus der Peripherie ankommenden unterschiedlichen Signale werden dort mit Hilfe von einer Vielzahl von Transmittern und Neuropeptiden verarbeitet, deren genaues Zusammenspiel nur in Ansätzen erforscht ist.

Die Regulation der Nahrungsaufnahme beginnt mit dem Hungergefühl und endet mit der Sättigung. Es spielen schon verschiedene Faktoren, wie sensorische Reize, Aussehen, Geruch und der Geschmack der Nahrung eine Rolle. Diese Reize müssen im Gehirn mit neuronalen und hormonellen Signalen aus dem Gastrointestinaltrakt und dem Stoffwechsel verbunden werden.

Die Nahrungsaufnahme führt über die Dehnungsrezeptoren des Magens zu einer neuronalen Aktivierung des Nervus vagus. Diese Information wird an die zentralen Informationszentren weitervermittelt. Schon im Magen wird zwischen flüssigen und festen Bestandteilen der Nahrung unterschieden.

Der N. vagus nimmt im Regelkreis der Nahrungsaufnahme zwar eine sehr wichtige Position ein, aber eine Vagotomie oder Magentransplantation heben die Regulation der Nahrungsaufnahme nicht völlig auf. Deshalb müssen noch weitere Faktoren in diesem komplizierten System eine Rolle spielen.

Das erst 1994 entdeckte, vom Fettgewebe produzierte Hormon Leptin scheint eine bedeutende Rolle für die Langzeitregulation des Körpergewichtes zu haben. Hingegen gelten Magen und Dünndarm schon seit Mitte des letzten Jahrhunderts als Ursprungsort peripherer Sättigungssignale, die vor allem der Kurzzeitregulation der Nahrungsaufnahme dienen. Beim Menschen und der Ratte nimmt der Magen eine wichtigere Rolle als der Dünndarm ein.

In den späten 60er Jahren ergaben sich die ersten Hinweise, dass neben dem vagalen System ein hormoneller Faktor bestehen müsse, der die Nahrungsaufnahme limitiert. So ergab sich bei Transfusion von Blut gesättigter Ratten eine Verminderung der Nahrungsaufnahme bei hungrigen Ratten.

Zusätzlich konnte eine Hemmung der Nahrungsaufnahme bei Füllung eines transplantierten, zweiten Magens, der keine neuronale Verbindung zu zentralen Gebieten hatte, dokumentiert werden (22). Die beiden schon bekannten gastralen Hormone Somatostatin und Gastrin, die bei Nahrungsaufnahme ins Blut sezerniert werden, zeigten bei Infusion physiologischer Konzentrationen keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme (97). So blieb der entscheidende humorale Faktor, der die Nahrungsaufnahme steuert noch unbekannt.

Erst 1999 gelang es einer japanischen Forschergruppe durch Zufall einen unbekanntem endogenen Liganden des Growth-hormone-secretagogue-Rezeptors (GHS-R) zu separieren. Die Entdecker taufte das Hormon „Ghrelin“, 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 anderer Hormone wirken (52). Dieses, aus 28 Aminosäuren bestehende, Polypeptid wird hauptsächlich vom Magen freigesetzt (83). Neben Stimulierung des Wachstumshormones zeigte sich bei exogener Zufuhr bei Nagetieren auch eine Gewichtszunahme. Damit könnte Ghrelin ein möglicher Kandidat für den humoralen Informationsweg vom Magen an den Hypothalamus sein.

Wie Ghrelin auf die verschiedenen Organsysteme wirkt, wurde in vielen wissenschaftlichen Publikationen behandelt. Jedoch wie die Ausschüttung von Ghrelin geregelt wird ist bislang noch ungeklärt. Dies ist in Bezug auf ein Verständnis der physiologischen Regulation der Nahrungsaufnahme und einer möglichen therapeutischen Nutzung von Ghrelin unerlässlich.

Im Hinblick auf diese Problematik wurde in dieser Arbeit auf mögliche Faktoren eingegangen, die die Sezernierung beziehungsweise Hemmung von Ghrelin bewirken.

Hierbei wurde die Wirkung von Vagusstimulation, CCK und GIP in verschiedenen Konzentrationen auf Ghrelin untersucht.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 200 bis 500g verwendet (*Charles River Wiga GmbH, Sulzfelden, Deutschland*).

Sie wurden im Veterinärbereich des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München unter standardisierten Bedingungen gehalten:

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

Die Versuchstiere wurden 12 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern gesetzt.

### **2.2 Vagusstimulation**

Bei diesen Experimenten werden die Nervi vagi mit einem elektrischen Impulsgeber (Voltstimulator, Grass Medical Instruments, W. Warwick, RI, USA) monophasisch stimuliert. Als Stimulationsparameter wurden in den Versuchen eine Spannung von 10V, eine Frequenz von 10Hz und eine Pulsdauer von 1ms verwendet. Die Platinelektroden wurden zur Schonung der Nervi vagi erst unmittelbar vor der Stimulationsphase am distalen Ende des leicht gespannten linken und rechten Nervus vagus befestigt und unter leichten Zug gesetzt, um eine optimale Impulsübertragung zu garantieren. Nach vierzig Minuten wurde die Stimulation beendet (Stimulationszeit von Minute 10 bis 50).

## 2.3 In Vitro Versuche

### 2.3.1 Präparationsbeschreibung

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

Die Ratten wurden nach Kohlendioxidinhalation durch eine intraperitoneale Pentobarbitalinjektion narkotisiert (Narcoren, 1ml/kg, Rhone- Merieux, Köln, Deutschland).

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

Die Präparation beginnt mit dem Eröffnen des Abdomens in der Medianlinie. Nach Darstellung des Magenantrums und proximalen Duodenums, sucht man den Lobus caudatus auf und mobilisiert diesen. Anschliessend stellt man die Milz dar und entfernt sie unter Schonung der gastroepiploischen Gefässe an der grossen Kurvatur.

Als nächstes wird das Pankreas, welches grösstenteils im Mesenterium des Duodenums liegt, durch Ligatur der Gefässe vom Duodenum abgesetzt. Das Duodenum wird ca. einen cm distal des Pylorus durch zwei Ligaturen verschlossen und durchtrennt.

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

1. Anschlingung proximal des Truncus coeliacus
2. Anschlingung zwischen Truncus coeliacus und Arteria mesenterica superior
3. Anschlingung unmittelbar distal der Arteria mesenterica superior

#### 4. Anschlingung unmittelbar proximal der linken Arteria renalis

Mit Anschlingung 4 wird der Blutfluss in der Aorta abdominalis nach distal unterbunden. Nach Ligatur der dorsalen Abgänge wird die Aorta cranial des Truncus coeliacus abgeklemmt und mit einem Katheter (Silastic-Katheter, D 1,5mm, Portex-Limited, Hythe, England) durch Inzision unmittelbar proximal der Anschlingung 4 kanüliert. Die Katheterspitze wird unmittelbar distal des Abgangs des Truncus coeliacus platziert und mit Anschlingung 2 und 3 fixiert. Der Katheter wird mit ein bis zwei ml heparinisierte 0,9% isotoner Kochsalzlösung (25000 I.E. Heparin- Natrium/ l NaCl) gespült, um eine Thrombosierung zu vermeiden. Dann wird die Klemme cranial des Truncus coeliacus wieder entfernt, um die Perfusion des Magens während der verbleibenden Präparationszeit zu gewährleisten.

Zur Katheterisierung der V. portae wird eine Mesenterialvene inzidiert, ein Katheter ( D 1.3mm, Portex) bis zur Einmündung der V. gastroepiploica dextra vorgeschoben und mit mindestens zwei Ligaturen fixiert. Um im Folgenden die Ischämiezeit bei der Gastrektomie zu verkürzen, entfernt man bereits zu diesem Zeitpunkt das Dünndarmkonvolut sowie grosse Teile des Kolons.

Ferner setzt man den subdiaphragmalen Ösophagus möglichst weit oral ab. Die Aorta abdominalis wird proximal des Truncus coeliacus ligiert (Anschlingung 1), die V. portae im Ligamentum hepatoduodenale. Dadurch ist der Magen nun weder perfundiert noch oxygeniert. Durch gründliches Spülen des Magens über den Aorten Katheter mit 20 ml heparinisierte isotoner Kochsalzlösung entfernt man das Blut aus den Gefässen und verhindert eine Thrombosierung. Schliesslich wird der Magen mit intakter Gefässversorgung aus dem Situs entfernt. Es wird je ein Katheter durch den Ösophagus (Perfusorleitung Typ N, Braun-Melsungen) und das Duodenum (Infusomat-Leitung Typ sec/II, Braun-Melsungen) in das Magenlumen vorgeschoben und fixiert, um den Magen während des Versuchs zur Aufrechterhaltung eines konstanten intragastralen pH- Wertes zu perfundieren.

Nach Spülung des Magenlumens mit ca. 40ml NaCl-Lösung zur Entfernung von Nahrungsrückständen wird der Magen in ein

Organbad mit auf 37°C temperiertem Krebs-Ringer-Puffer eingebracht und über eine Rollenpumpe (STA-Schlauchpumpe, Desaga GmbH, Heidelberg, Deutschland) vaskulär und luminal mit einem Flow von 1,5 ml/min kontinuierlich perfundiert. Die vaskuläre Perfusion erfolgt mit einem modifizierten Krebs-Ringer-Puffer (154 mMol NaCl, 154 mMol KCl, 110 mMol CaCl<sub>2</sub>, 154 mMol KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 154 mMol MgSO<sub>4</sub>, 154 NaHCO<sub>3</sub>, Dextran 4 g/100ml, Glucose 100 mg/100ml, Albumin 0.2%, pH- Einstellung auf 7.35, mit 95% O<sub>2</sub>- und 5% CO<sub>2</sub>- Sättigung). Das vaskuläre Perfusat wird über den portalen Venenkatheter gesammelt und sofort bis zur quantitativen Bestimmung von Ghrelin mittels Radioimmunessay bei -18°C eingefroren.

Die Operationszeit beträgt etwa 30 Minuten. Die Ischämiezeit vom Ligieren der Aorta abdominalis bis zum Anschluss an das Perfusionssystem beträgt ca. 10 Minuten.

### **2.3.2 Versuchsprotokoll**

Für den Versuch werden folgende Dinge benötigt:

- 1 Fraktionssammler:2212 Helirac, LKB, Bromma
- 2 Reagenzröhrchen:4.5ml, Greiner-Bio- One
- 3 Stopfen zu den Röhrchen:Greiner
- 4 Rollenpumpenschlauch ( zweimal):Roth

Der Versuchsablauf geht wie folgt:

- 1 Minute -15 bis 0: Äquilibrationsphase. Vaskulär wird der Magen den gesamten Versuch über mit modifizierter Krebs-Ringer-Puffer-, luminal mit isotoner Kochsalzlösung (pH-Wert 2.0) mit einer Peristaltikpumpe mit 1.5ml/min perfundiert. Das luminale Perfusat wird verworfen.
- 2 Minute 0 bis 10: Vorlaufphase. Die vaskulären Proben werden zur Bestimmung des basalen Plasmaghrelinspiegels über ein Intervall von je einer Minute in den Reagenzröhrchen mithilfe des Fraktionierers

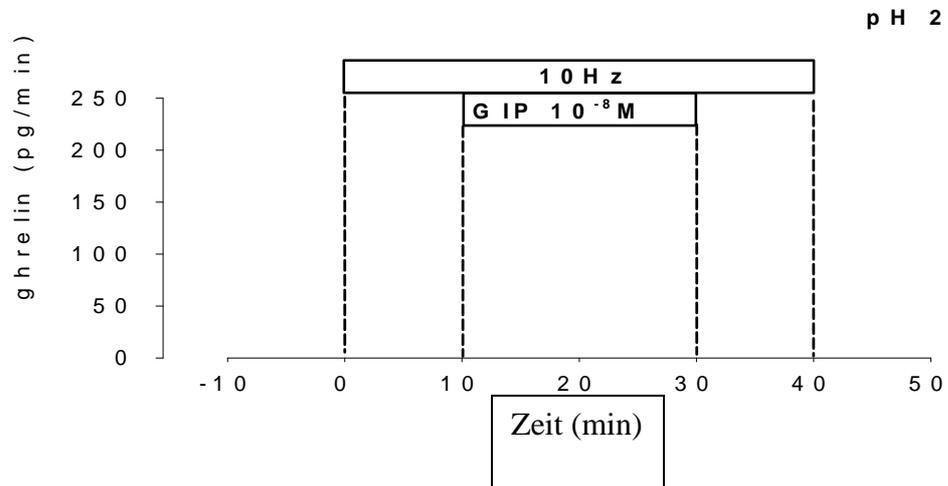
gesammelt.

- 3 Minute 10 bis 20: Vagusstimulation.
- 4 Minute 20 bis 40: Vagusstimulation und zusätzlich geänderte vaskuläre Perfusion des Magens (GIP, Glukose, CCK in verschiedenen Konzentrationen).
- 5 Minute 40 bis 50: Zurückschalten auf „normale“ Krebs-Ringer-Puffer Perfusion (siehe unter 2.3.1) des Magens unter Belassen der Vagusstimulation
- 6 Minute 50 bis 60: Wie Minute 0 bis 10.

Das Perfundat der Versuchszeit –15 bis 0 wird verworfen. Aufgefangen und im Labor weiterbearbeitet wird das Perfundat in der Versuchszeit 0 bis 60 Minuten.

Die Vagusstimulation erfolgt mit 10 Hertz, 10 Volt in 1 Millisekunde.

Eine Änderung des Versuchsablaufs gibt es bei den GIP-Konzentrationen. Dort findet der Versuch ohne Vagusstimulation statt und dauert somit ohne Äquilibration 40 Minuten. Beim Somatostatinantagonisten wurde anstatt der vagalen eine Vorstimulierung durch GIP durchgeführt.



*Abb.1: Schematische Darstellung des Versuchstablaufts mit Vagusstimulation und unterschiedlichen Konzentrationen von GIP. Anstelle des GIP, wie in der Abbildung, wurden auch andere Hormone wie CCK eingesetzt. Die Vagusstimulation wurde von Minute 0 bis 40 durchgeführt, GIP oder CCK wurden von Minute 10 bis 30 dem Perfusat zugesetzt.*

#### **Legende Hauptversuch:**

anstatt Krebs-Ringer-Puffer ohne Zusatz wird

**Glukose**

**GIP** (BACHEM Biochemia GmbH, Heidelberg; MW 4975,66 net)

**CCK** (CCK Octapeptide, sulfated; TOCRIS, Bristol; MW 1142,20)

mit Krebs-Ringer gemischt perfundiert.

## **2.4 Versuchsauswertung**

### **2.4.1 Bestimmung der Ghrelinkonzentration im Perfusat**

Die Ghrelinkonzentration wurde mit einer radioimmunologischen Methode bestimmt. Es wurde dazu ein im Handel erhältlicher Ghrelin Radioimmunoassay Kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc., California) verwendet. Das Prinzip des kompetitiven Radioimmunoassays besteht darin, dass das zu messende Hormon in einer Plasmaprobe mit radioaktiv markierten Molekülen (Tracer) um die Bindungsstellen an spezifischen Antikörpern konkurriert. Der Anteil an gebundener Radioaktivität verhält sich umgekehrt proportional zur Konzentration des zu bestimmenden Hormons. Der verwendete Kit enthielt als Tracer-Lösung ein mit Iod 125 markiertes Ghrelin und als Antiserum anti-humanes Kaninchen-Ghrelin, das laut Hersteller keine Kreuzreaktionen mit GIP, CCK und Insulin aufweist.

Der Interassay-Variationskoeffizient lag bei 10% und der Intra-Assay Variationskoeffizient bei 4%.

### **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 +/- SEM angegeben.

Alle Daten wurden durch ein Programm ausgewertet und analysiert (SigmaStat, Jandel, Erkrath, Germany).

Zur statistischen Auswertung der Daten innerhalb der Gruppen wurde ein gepaarter t-Test verwendet (Friedmann-Test für den Vergleich verbundener Messwerte). Falls dieser ein Verwerfen der Nullhypothese erlaubte, wurde daraufhin der Wilcoxon-Rangsummentest angewandt. Werte mit  $p \leq 0.05$  wurden als signifikant angesehen.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Vagusstimulation**

Während der elektrischen vagalen Stimulation mit 10V und einer Impulsdauer von 1ms, konnte eine signifikante Stimulation der Ghrelinsekretion von ca. 1600pg/min dokumentiert werden ( $p < 0,05$ ;  $n=10$ ; Abb. 2). Es wurde mit einer Frequenz von 10Hz stimuliert.

Nach einer Vagusstimulation von vierzig Minuten wurde die Stimulation beendet und, wie in Abb.4 ersichtlich, sanken die Ghrelinwerte wieder auf das Ausgangsniveau von ca. 800pg/min ab.

Die basalen Ghrelinspiegel waren sehr niedrig, deswegen wurden alle Versuche unter vagaler Vorstimulierung durchgeführt. Der Hauptversuch mit Hormonen und Glukose in verschiedenen Konzentrationen dauerte jeweils zwanzig Minuten. Bei jedem Versuch wurde zehn Minuten vorstimuliert und nach dem Hauptversuch dauerte die Stimulierung noch zehn Minuten an. Bei GIP wurde eine Versuchsreihe auch ohne Vorstimulierung durchgeführt und beim Somatostatinantagonisten wurde die Vagusstimulation durch eine Vorlaufphase mit GIP ersetzt.

Pro Rattenmagen wurde jeweils nur ein Versuch durchgeführt.

#### **3.2 Effekt des GIP**

Der Versuchsablauf (Gesamtzeit 60 Minuten) am Rattenmagen bei pH 2 ist schematisch in Abb.1 dargestellt. Wie im Kapitel Material und Methodik beschrieben, dauerte der Gesamtversuch 60 Minuten, davon der Hauptversuch 20 Minuten.

Die Versuche mit GIP in verschiedenen Konzentrationen wurden auch ohne vagale Vorstimulierung durchgeführt. Der gesamte Versuch dauerte dann nur 40 Minuten und die, mit GIP angereicherte Krebs-Ringer-Lösung wurde direkt nach 10 Minuten Vorlauf für 20 Minuten durchgeführt. Es schloss sich wieder eine 10 Minuten dauernde Nachbeobachtungsphase an, in der der Magen mit physiologischer Krebs-Ringer-Lösung durch

den Magen perfundiert wurde.

Die Vitalität des Magens wurde am Ende eines jeden Versuchs mithilfe von einer Kaliumchlorid Perfusion dokumentiert.

Während der Infusion von GIP  $10^{-12}$  M betragen die interferierten Ghrelinwerte  $-1004 \pm 743$  pg/20 min bei  $n=4$  Rattenmägen. Bei der Konzentration von  $10^{-10}$  M wurden fünf Mägen ausgewertet und die Ghrelinsekretion lag bei  $-2586 \pm 1801$  pg/20 min. In Abb. 3 ist der 20-minütige Verlauf bei  $160 \pm 10$  pg/min beschrieben.

Bei der GIP Konzentration von  $10^{-9}$  M konnten bei zehn Mägen Werte von  $-1627 \pm 2352$  pg/20 min und  $100 \pm 35$  pg/min gemessen werden. Es konnte schon eine Steigerung der Ghrelinsekretion beobachtet werden, aber diese war noch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Insgesamt kann über die Konzentrationen von GIP  $10^{-12}$  M, GIP  $10^{-10}$  M und GIP  $10^{-9}$  M gesagt werden, dass keine signifikante Erhöhung der Ghrelinsekretion des vorstimulierten Magens beobachtet werden konnte ( $p > 0,05$ ).

Niedrigere Konzentrationen von GIP, bei fehlender Vorstimulierung, zeigten keinen Effekt auf die Ghrelinsekretion (Abb.5).

Bei einer GIP Konzentration von  $10^{-10}$  M lagen die Ghrelinwerte bei ca.  $-700 \pm 200$  pg/20min und bei  $10^{-9}$  M bei ca.  $-1000 \pm 300$  pg/20min. Bei  $p > 0,05$  konnte keine Signifikanz festgestellt werden (Abb. 5).

In Zusammenhang mit GIP  $10^{-8}$  und GIP  $10^{-7}$  jedoch wurden beim vorstimulierten Magen mit  $6775 \pm 1580$  pg/20 min ( $n=8$ ;  $p < 0,05$ ) und  $8966 \pm 2740$  pg/20 min ( $n=6$ ;  $p < 0,05$ ) signifikante Erhöhungen der Ghrelinsekretion festgestellt (Abb. 4).

Wurde der Versuch bei GIP  $10^{-8}$  M ohne vagale Vorstimulierung durchgeführt ( $n=7$ ), konnten Ghrelinwerte von  $2614 \pm 945$  pg/20 min dokumentiert werden. Diese entsprachen einer signifikanten Erhöhung ( $p < 0,05$ ) (Abb. 5).

Zusammenfassend zeigen die Abbildungen 6 und 7 den Effekt

unterschiedlicher GIP-Konzentrationen ( $10^{-7}$  bis  $10^{-12}$ ) mit und ohne Vagusstimulation auf die Ghrelinsekretion. Die mit einem Sternchen gekennzeichneten Säulen weisen eine Signifikanz auf.

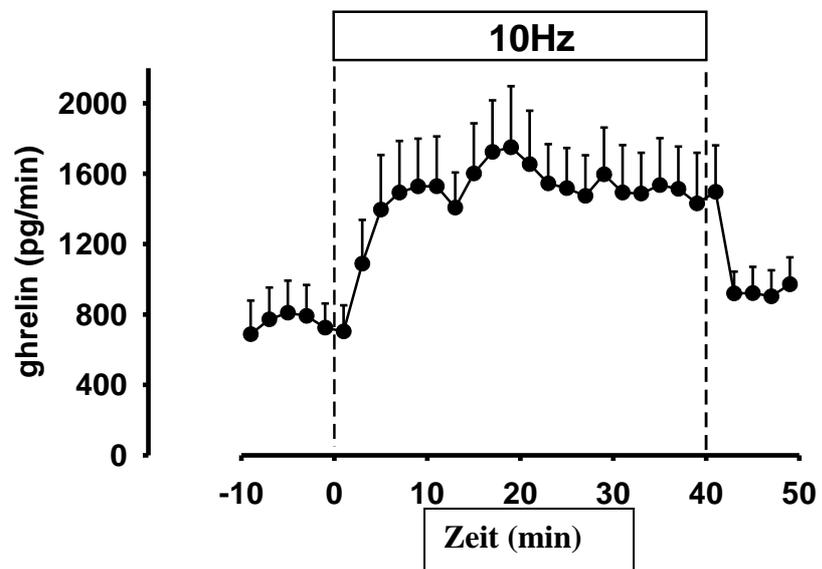


Abb.2: Einfluss einer Vagusstimulation mit 10 Hz, 10 V, 1 ms auf die Ghrelinsekretion im isolierten Rattenmagen (n=8).

pH 2

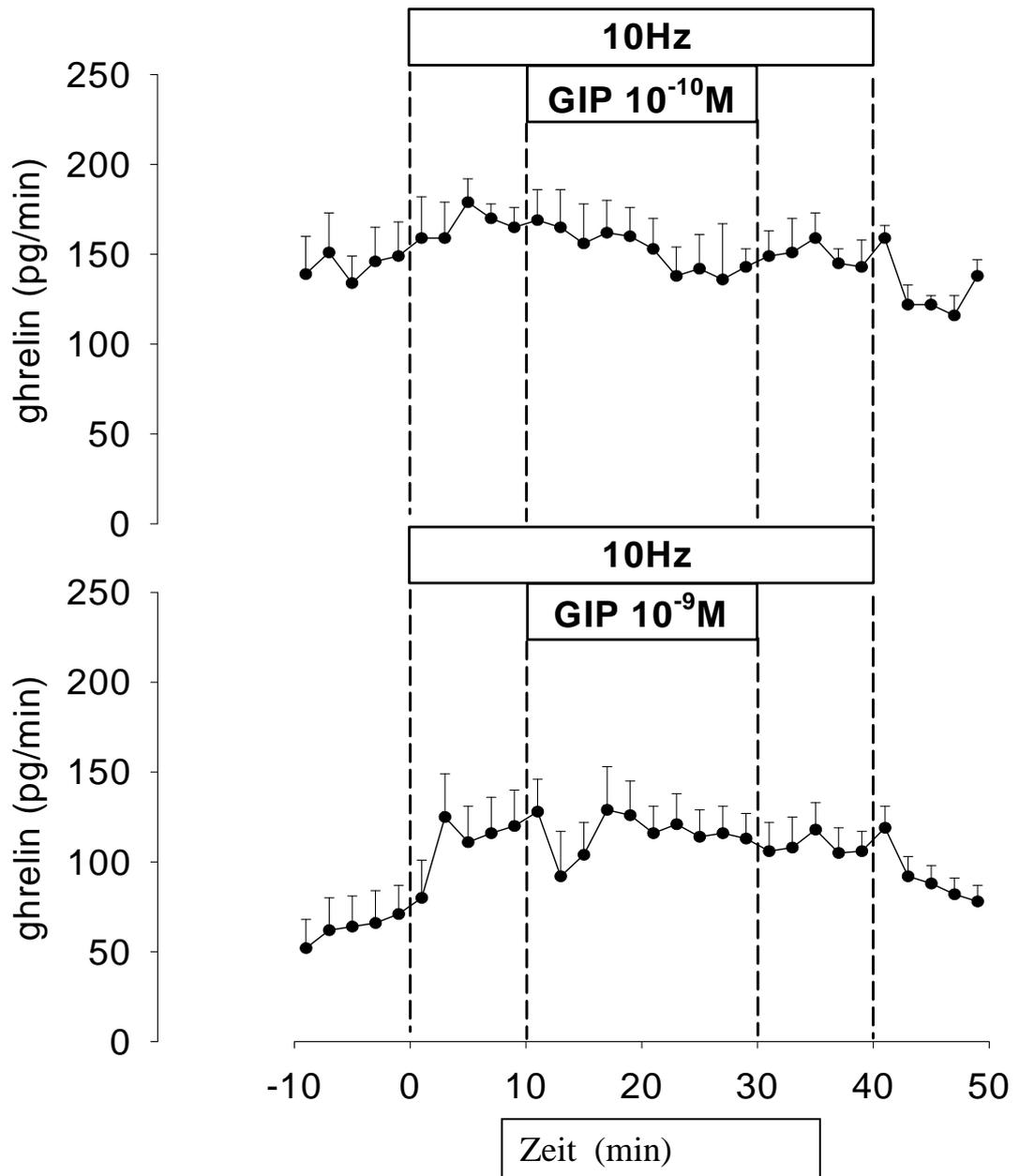


Abb. 3: Verlauf der Ghrelinsekretion nach Vorstimulierung des N. Vagus mit 10 Hz und anschliessender Gabe von GIP in den Konzentrationen  $10^{-10}M$ ,  $n=5$ , und  $10^{-9}M$ ,  $n=10$ . Es wurde keine signifikante Veränderung festgestellt ( $p>0,05$ ).

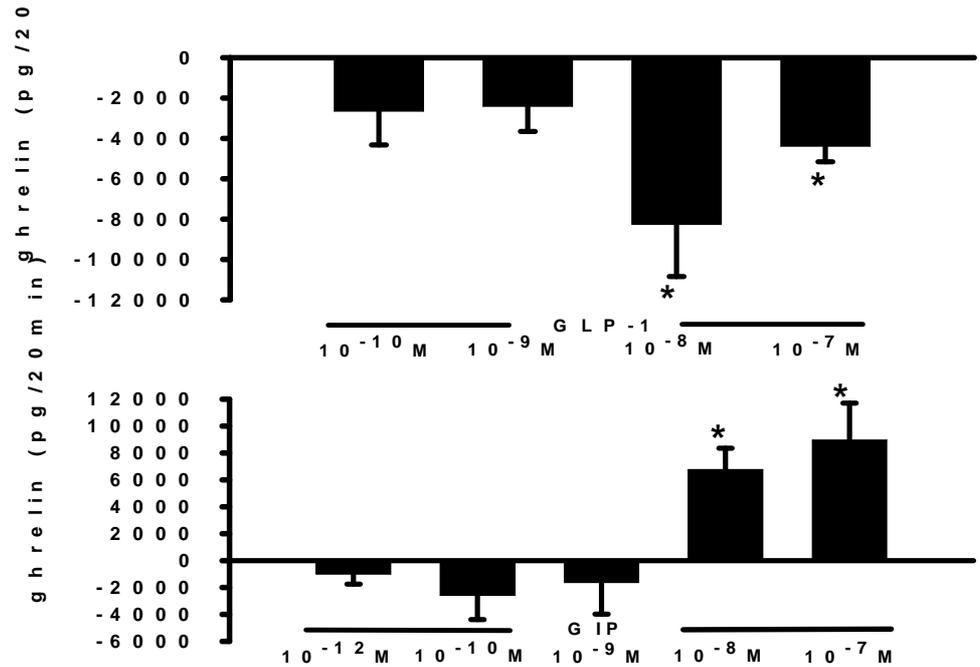


Abb. 4: Einfluss der verwendeten GIP- Konzentrationen auf die Ghrelinsekretion des Magens mit Vorstimulierung. Die mit \* gekennzeichneten Säulen weisen eine signifikante Ghrelinausschüttung auf. ( $p < 0,05$ )

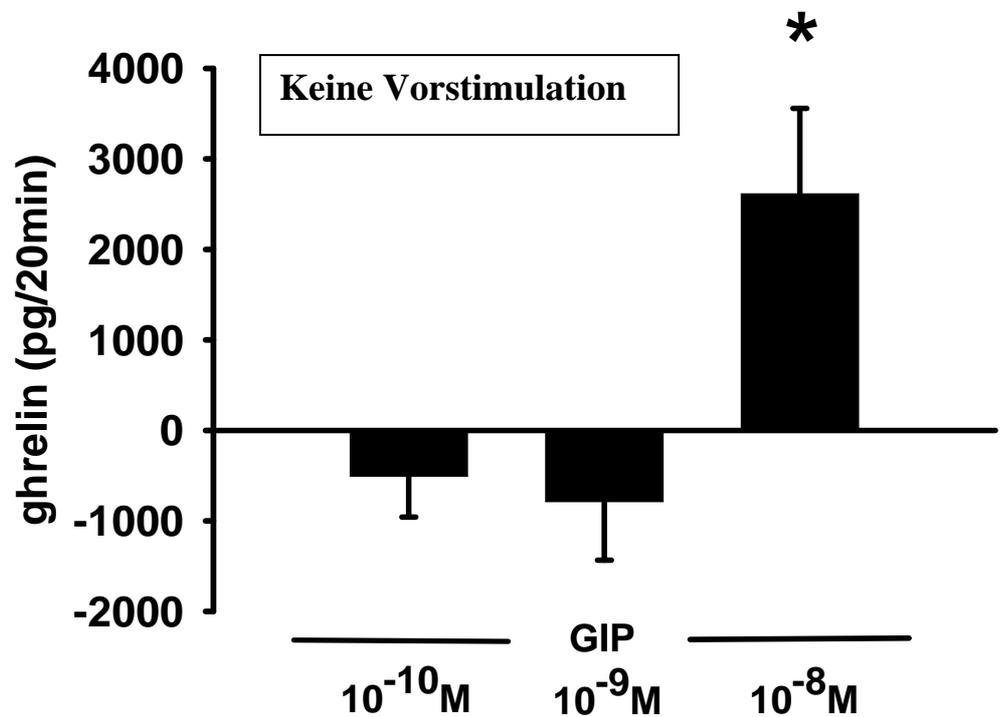


Abb. 5: Ghrelinsekretion bei verschiedenen GIP- Konzentrationen, ohne Vagusstimulation. Die mit \* gekennzeichnete Säule zeigt eine signifikante Ghrelinausschüttung. ( $p < 0,05$ )

### 3.3 Effekt von CCK-8 und CCK-9

Wie bei den anderen Versuchen, wurde auch mit CCK-8 und CCK-9 verfahren. Der gesamte Versuch dauerte 60 Minuten. Nach 15 Minuten andauernder Äquilibrationsphase folgten 10 Minuten Vorversuch. Im Anschluß kamen 40 Minuten vagale Stimulation. Nach 10 minütiger Vorstimulierung des Rattenmagens folgte der 20 Minuten andauernde Hauptversuch, bei dem die physiologische Magenperfusion, auf eine mit CCK-9 oder CCK-8 angereicherte Lösung gewechselt wurde. Danach wurde wieder mit der physiologischen Krebs- Ringer- Lösung ohne Hormonzusatz perfundiert. Die vagale Stimulation wurde beibehalten. Der Nachversuch wurde 10 Minuten nach Abschalten der elektrischen Stimulation durchgeführt. (Abb.8)

Das CCK-Oktapeptid (Konzentration  $10^{-9}$ ) hatte auf die Ghrelin-Sekretion keinen signifikant steigernden Effekt,  $p > 0,05$ . Nach Vorstimulierung erhöhten sich die Ghrelinwerte von ca. 600 auf  $680 \pm 300$  pg/min (Abb. 9).

In einer Konzentration von  $10^{-8}$ M konnte auch keine Signifikanz dokumentiert werden,  $p > 0,05$ . Die Werte stiegen nach Vorstimulierung nicht weiter an (Abb. 10).

Genauso wenig ist eine signifikante Ghrelinsekretion bei höheren Konzentrationen, wie  $10^{-7}$ M aufgefallen. Die Ghrelinwerte stiegen von 500 auf ca.  $620 \pm 100$  pg/min ( $p > 0,05$ ) (Abb. 11).

Auch das CCK- Nonapeptid konnte in verschiedenen Konzentrationen keine signifikanten Veränderungen der Ghrelinsekretion auslösen ( $p > 0,05$ ).

In einer Konzentration von  $10^{-10}$  sowie  $10^{-6}$  des Peptids zeigte sich nach Stimulierung keine vermehrte Ghrelinsekretion. Bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  stiegen die Ghrelinwerte von ca. 100 auf ca. 140 pg/min an (nicht signifikant,  $p > 0,05$ ).

Die folgenden Abbildungen zeigen den Effekt von CCK-9 in aufsteigender Konzentration auf die Ghrelinsekretion (Abb. 12; Abb. 13; Abb.14).

Zusammenfassend sieht man in Abb. 14 die oben gezeigten Kurven zur Verdeutlichung des nicht signifikanten Ghrelin-Effekts ( $p > 0,05$ ). Bei einer Nonapeptid-Konzentration von  $10^{-10}$  zeigten sich Werte von  $-190 \pm 120$ , bei  $10^{-8}$   $280 \pm 520$  und bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  Ghrelinwerte von  $-200 \pm 120$ .

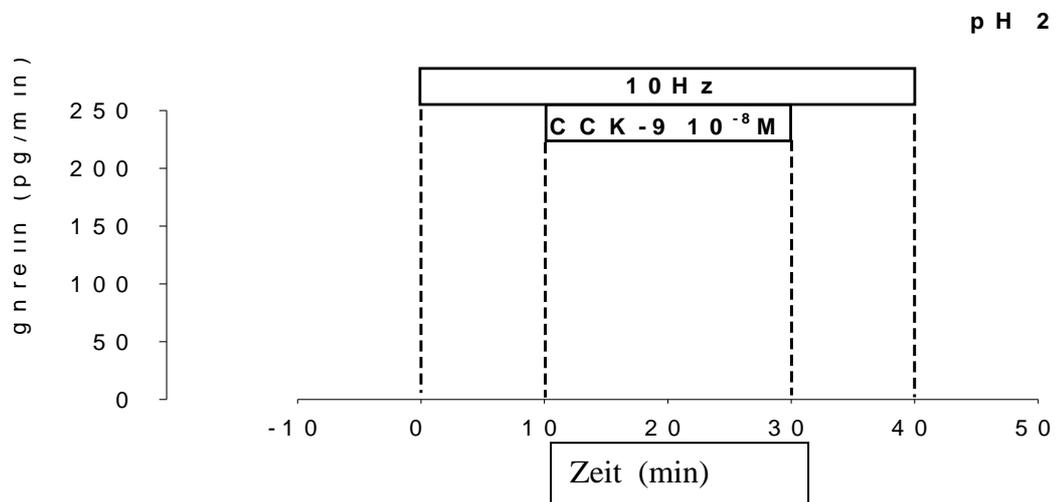


Abb.: 8: Versuchstabelleaus mit Vagusstimulation und unterschiedlichen Konzentrationen von CCK. Die Vagusstimulation wurde von Minute 0 bis 40 durchgeführt, der Hauptversuch mit CCK von Minute 10 bis 30.

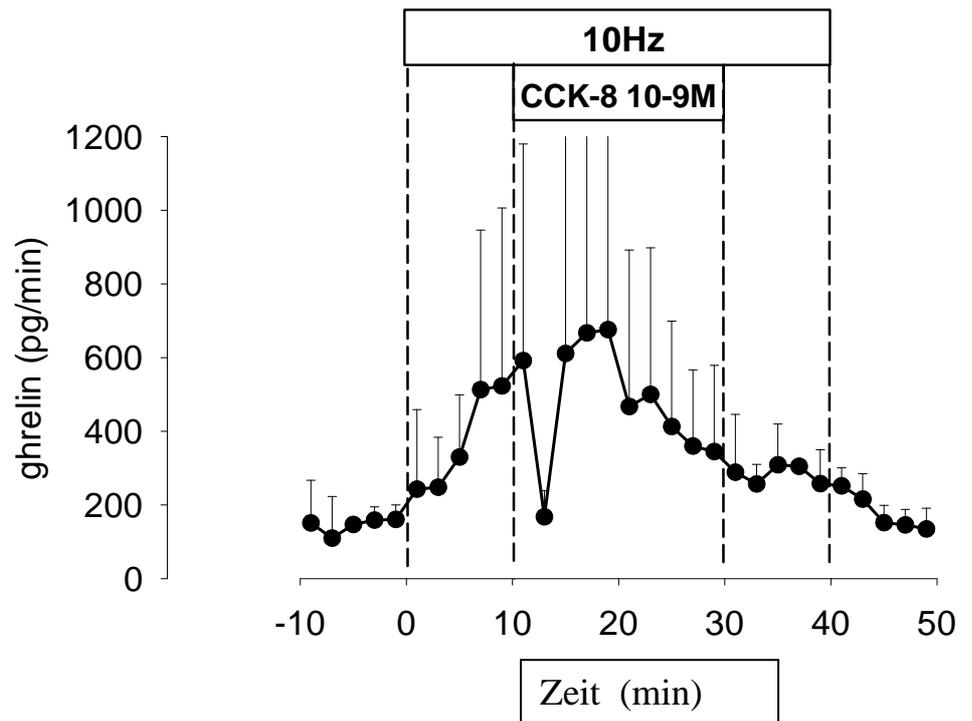


Abb. 9: Effekte des CCK- Oktapeptids in der Konzentration von  $10^{-9}M$  auf die Ghrelinsekretion des Magens. Es konnte keine signifikante Veränderung dokumentiert werden ( $p > 0,05$ ,  $n=8$ ).

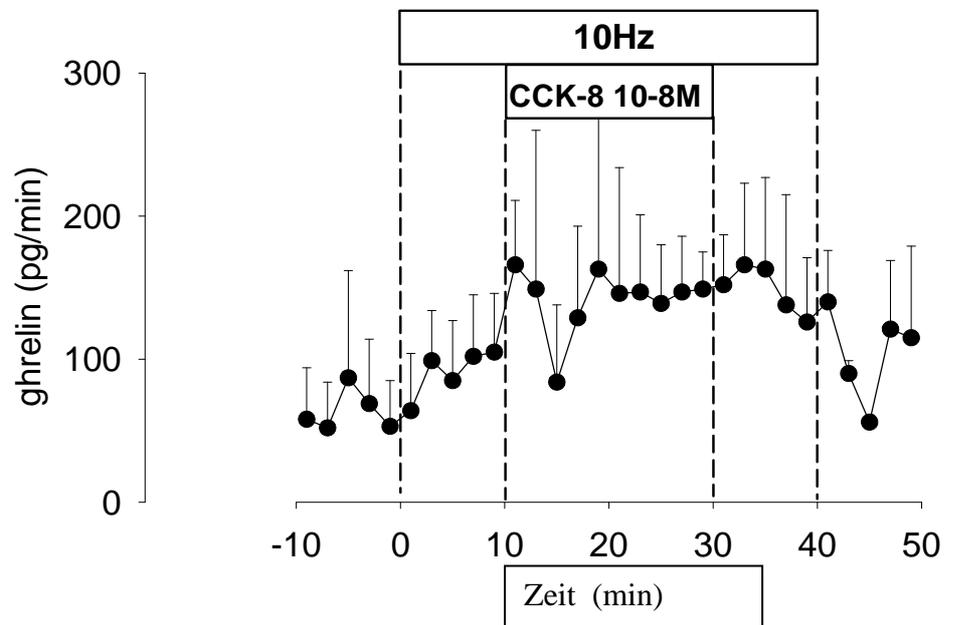


Abb. 10: Effekte des CCK- Oktapeptids in der Konzentration von  $10^{-8}M$  auf die Ghrelinsekretion des Magens. Es konnte keine signifikante Veränderung dokumentiert werden ( $p > 0,05$ ,  $n=8$ ).

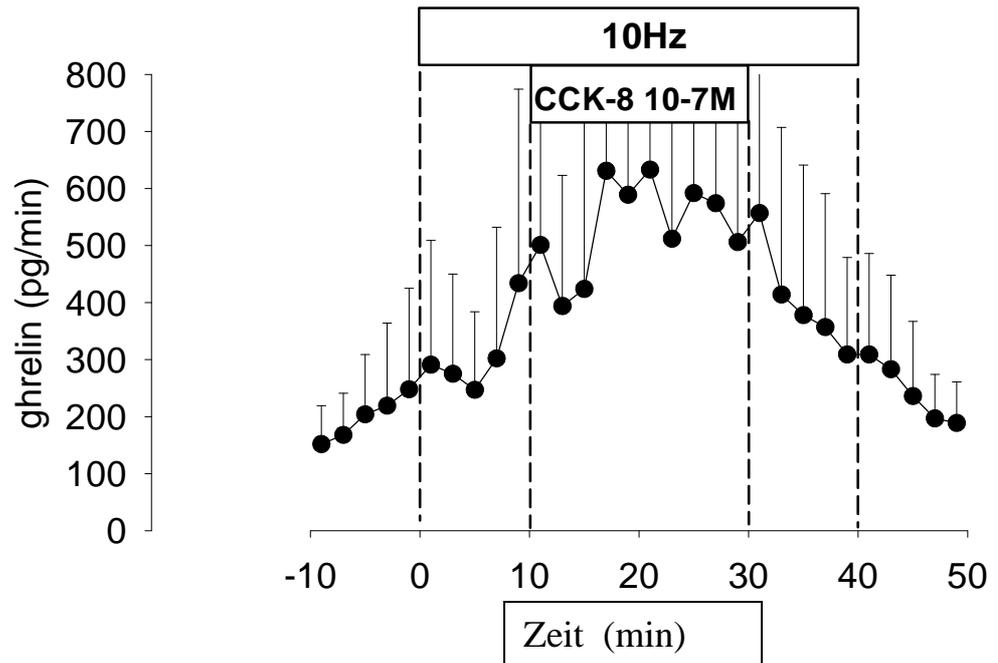


Abb. 11: Effekte des CCK- Oktapeptids in der Konzentration von  $10^{-7}$  auf die Ghrelinsekretion des Magens.. Es konnte keine signifikante Veränderung dokumentiert werden ( $p > 0,05$ ,  $n=8$ ).

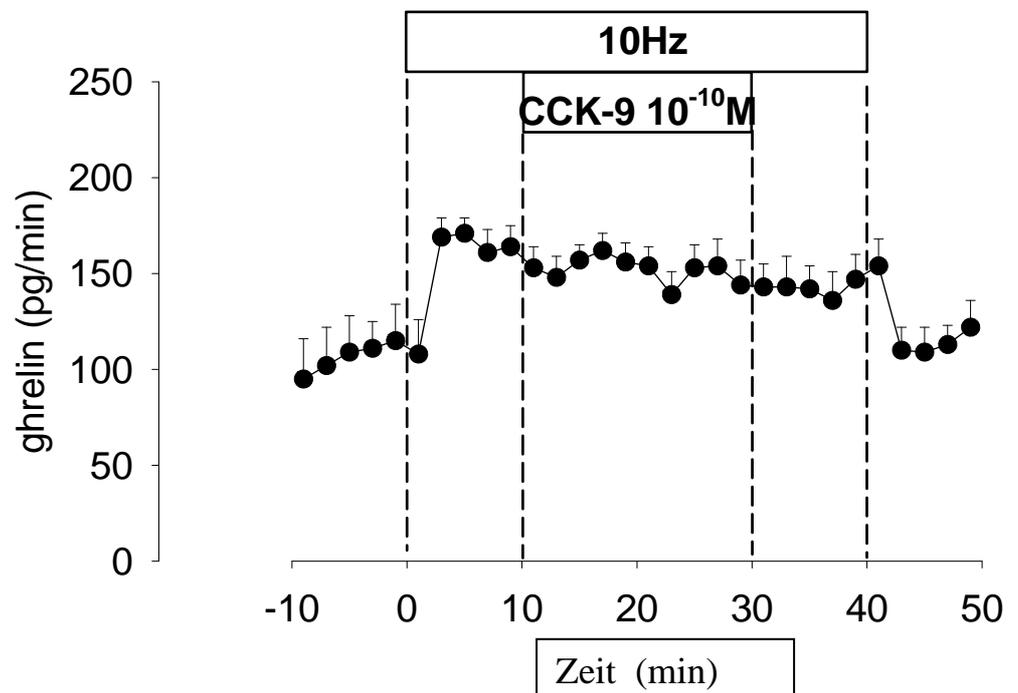


Abb. 12: Effekte des CCK- Nonapeptids in der Konzentration von  $10^{-10}$  auf die Ghrelinsekretion des Magens. Es konnte keine signifikante Veränderung dokumentiert werden ( $p > 0,05$ ,  $n=8$ ).

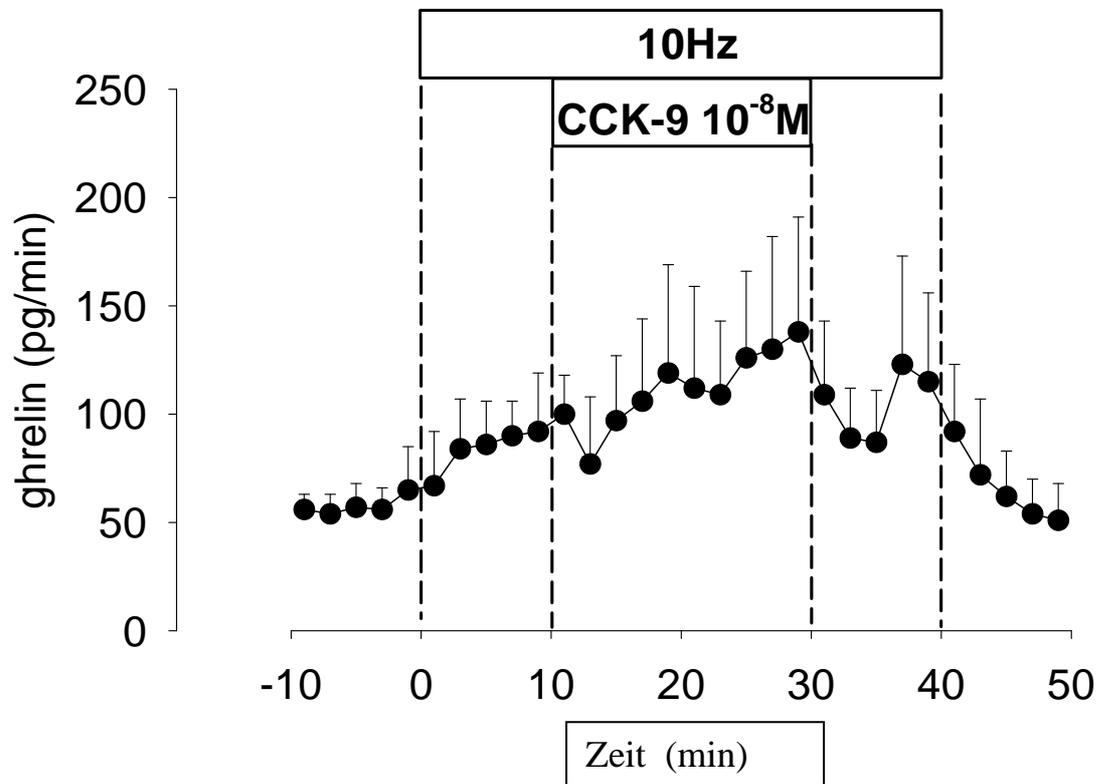


Abb. 13: Effekte des CCK- Nonapeptids in der Konzentration von  $10^{-8}$  auf die Ghrelinsekretion des Magens. Es konnte keine signifikante Veränderung dokumentiert werden ( $p > 0,05$ ,  $n=8$ ).

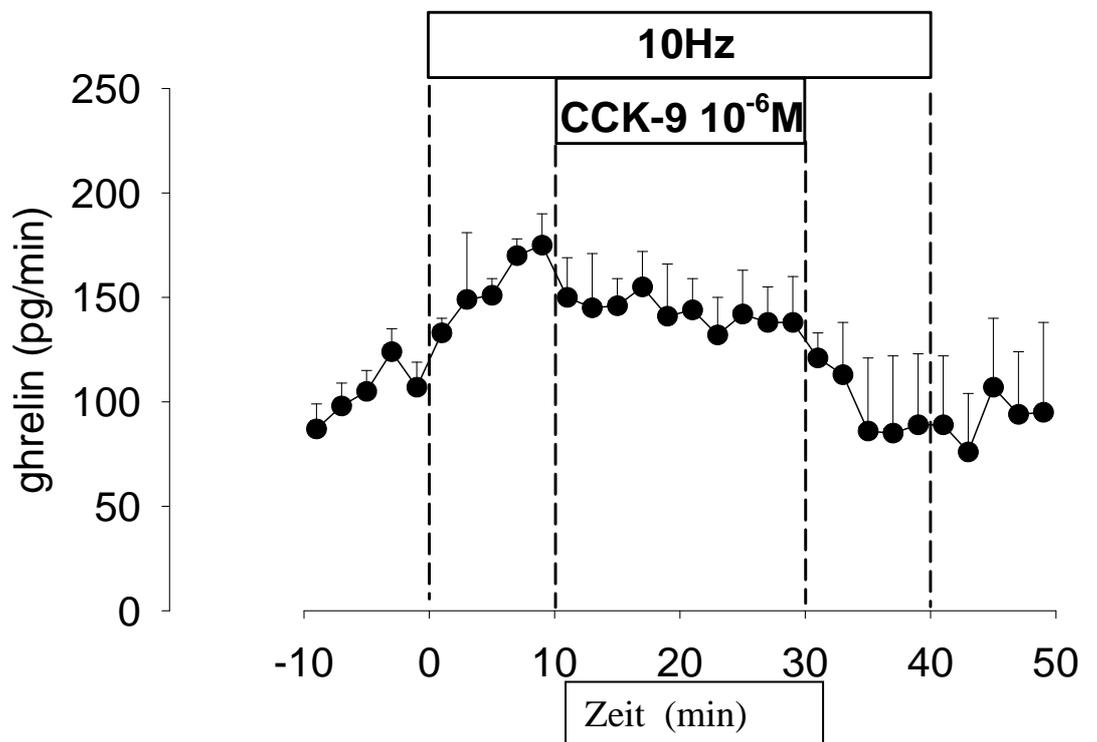


Abb. 14: Effekte des CCK- Nonapeptids in der Konzentration von  $10^{-6}$  auf die Ghrelinsekretion des Magens. Es konnte keine signifikante Veränderung dokumentiert werden ( $p > 0,05$ ,  $n=8$ ).

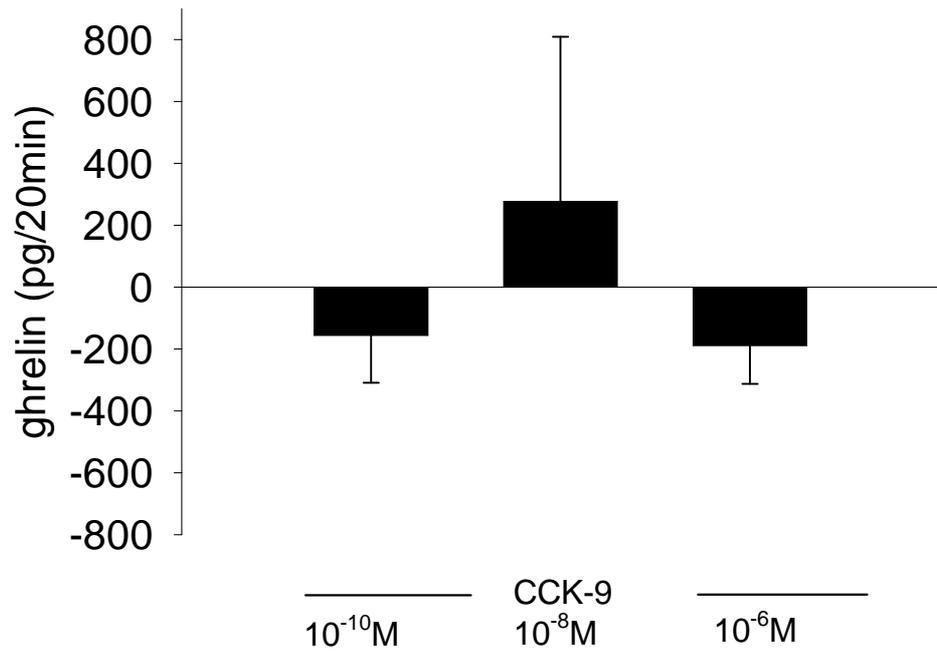


Abb. 15: Zusammenfassende Darstellung der Effekte des CCK-Nonapeptids auf die Ghrelinsekretion des Magens. Die Konzentrationen waren  $10^{-10}M$ ,  $10^{-8}M$  und  $10^{-6}M$ . Keine der Konzentrationen zeigte einen signifikanten Effekt auf die Sekretion ( $p > 0,05$ ).

### 3.4 Effekt der Hyperglykämie auf die Ghrelinfreisetzung

Bei den Versuchen mit Hyperglykämie wurden zur Krebs-Ringer-Lösung 300 mg% Glucose zugegeben. So wurde der hyperglykämische Effekt simuliert mit n=8.

Während der Vagusstimulation wurde die Glukosekonzentration im Perfusat von 100 mg% auf 300 mg% erhöht. Dies führte zu keiner signifikanten Veränderung der Ghrelinsekretion (Abb. 16),  $p > 0,05$ .

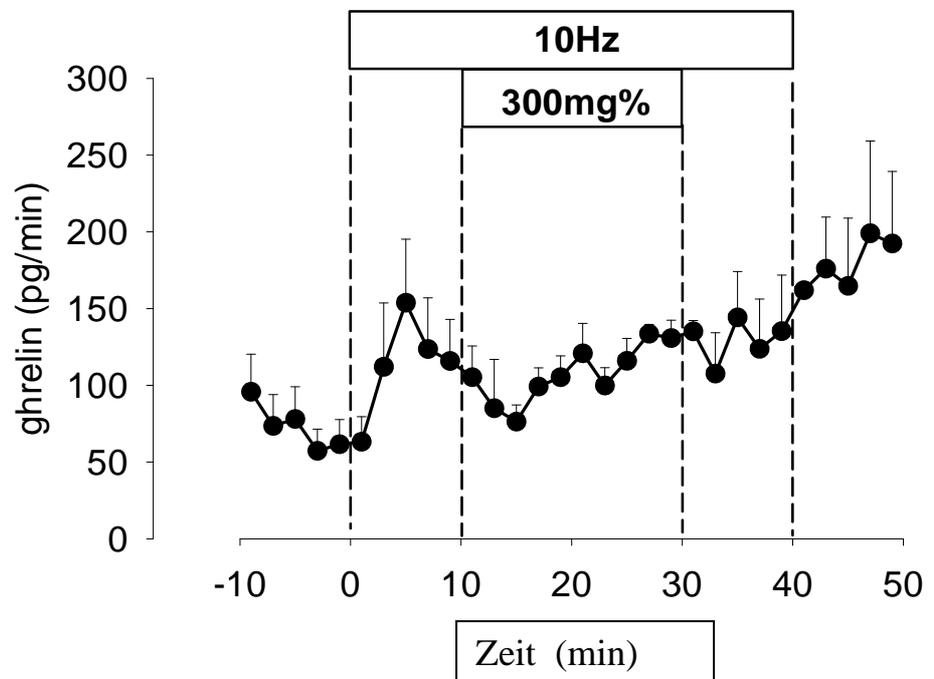


Abb. 16: Ergebnisse des Hyperglykämieversuches auf die Ghrelinsekretion des Magens. Die Hyperglykämie wurde mit 300mg/100ml Glukose durchgeführt (n=8).

## 4. Allgemeine Diskussion

Wie schon in der Einleitung beschrieben, gibt es viele verschiedene Faktoren, die stimulierend auf die Nahrungsaufnahme wirken oder sie hemmen.

An der Kurzzeitregulation des Sättigungsverhaltens ist besonders der Magen beteiligt. Wird bei Ratten z.B. Nahrung aus dem Magen entfernt, tritt eine Kompensation in Form von gesteigerter Nahrungsaufnahme ein. Wird jedoch eine Pylorusklemme eingesetzt und so der Transport der Nahrung in den Dünndarm gehemmt, bleibt die Nahrungsaufnahme gegenüber Vergleichstieren identisch (25), (44), (54).

Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass die Nahrungsaufnahme bei Ratten von der Magenentleerungszeit (55) und der Magenfüllung (123) abhängig ist, was auch beim Affen bestätigt werden konnte (43).

Beim Menschen konnte durch die Arbeitsgruppe Welch et al. gezeigt werden, dass die Infusion von Fett in den distalen Dünndarm (Jejunum und Ileum) die Nahrungsaufnahme hemmen kann (118) (117).

Allerdings wurde bei diesen Versuchen Fett in unphysiologischen hohen Raten von knapp 5 kcal/min zugeführt. Unter physiologischen Bedingungen ist die Magenentleerungszeit von Fett oder anderen Nährstoffen wesentlich niedriger, bei 1-2 kcal/min. Das bedeutet, dass nach Durchmischung mit Gallensäuren und pankreatischer Lipase wesentlich kleinere Mengen von unverdautem Fett in Kontakt mit weiter distal gelegenen Abschnitten des Dünndarms kommen würden, als bei Welch`s Versuchen. So hohe Mengen von Fett würden nur unter unphysiologischen Bedingungen wie bei einer Magenresektion, Dumping- Syndrom, Malassimilations- Syndrom oder Kurzdarm- Syndrom auftreten.

Bei Menschen ist in erster Linie der Magen für die Sättigungssignale zuständig, wie Schick et al. mit seinen Versuchen feststellen konnte. Er legte bei männlichen Probanden eine duodenale Sonde und applizierte ihnen eine Flüssignahrung (Biosorb) mit einer Rate von 1,6 kcal/min. Bei der Applikation der

Nahrung in den Magen wurde eine Reduktion der Nahrungsaufnahme beobachtet, wohingegen bei Applikation in das Duodenum kein Unterschied in der Nahrungsaufnahme beobachtet werden konnte (93).

Zusätzlich zu Nährstoffen zeigten Untersuchungen von Geliebter et al., dass eine Magendehnung von mindestens 400 ml die Nahrungsaufnahme supprimieren kann (42).

Die Nahrungsaufnahme wird auch noch zentral geregelt, hauptsächlich über den Nervus vagus und die Nervi splanchnici. Im Nervus vagus sind auf Zwerchfellhöhe etwa 97% aller Fasern afferent und nur etwa 3% efferent (48). Dies spricht für die überragende Bedeutung dieses Nerven für die Informationsübermittlung aus der Peripherie zum Zentralnervensystem.

Hinweise für die Beteiligung afferenter Vagusfasern ergeben sich aus folgenden Studien:

die pharmakologisch- inhibitorische Wirkung von CCK auf die Futteraufnahme wird durch vagale Afferenzen vermittelt, da der CCK- induzierte Sättigungseffekt bei der Ratte nicht nur durch abdominelle oder gastrale Vagotomie, sondern auch durch selektive Zerstörung afferenter Fasern mit Hilfe des Neurotoxins Capsaicin blockiert werden kann (106) (108). Es konnte gezeigt werden, dass CCK die Impulsrate gastraler afferenter Vagusfasern steigern kann (100). Daher stellt sich die Frage, ob eine Aktivierung afferenter Vagusfasern auch induziert werden kann durch Stimuli, wie sie physiologischerweise im Rahmen einer Mahlzeit auftreten, nämlich über volumetrische Dehnung des Magens und chemische Stimulation durch die in der Mahlzeit enthaltenden Nährstoffe. Untersuchungen von Gonzales und Deutsch konnten hier zeigen, dass bei Ratten die durch Dehnung induzierte Sättigung nach Vagotomie nicht mehr nachweisbar ist, während die Reduktion der Nahrungsaufnahme, bedingt durch die in der Nahrung enthaltenden Nährstoffe, durch Vagotomie nicht beeinflusst wird (44).

Weitere Erkenntnisse zur Bedeutung afferenter Vagusfasern für die Regulation der Nahrungsaufnahme stammen aus tierexperimentellen Untersuchungen, in denen als Parameter für die Aktivierung der gastral- vagal-hypothalamischen Achse die Freisetzung von neuronalem CCK aus Nervenendigungen im lateralen Hypothalamus gemessen wurde. Die Bestimmung der

neuronalen CCK- Freisetzung in diesem Kerngebiet ist insofern von Relevanz, als CCK im lateralen Hypothalamus die Nahrungsaufnahme hemmt, und zwar nicht nur das exogen applizierte CCK (87) (92), sondern auch das dort lokal freigesetzte endogene CCK, wie mit Hilfe von spezifischen CCK-Rezeptor- Antagonisten (28) (94) nachgewiesen werden konnte. Der Stimulus für die CCK- Freisetzung wird durch Magendehnung hervorgerufen. Diese muss nicht unbedingt aus Nährstoffen bestehen, sondern kann auch durch Wasser induziert werden (96) (90) (89). Wird bei den Versuchstieren zuvor eine bilaterale zervikale Vagotomie durchgeführt, so kann eine hypothalamische CCK- Freisetzung nach intragastraler Testmahlgabe nicht mehr beobachtet werden (91).

Insgesamt zeigen diese Befunde, dass die volumetrische Dehnung des Magens zur Steigerung der neuronalen Aktivität im lateralen Hypothalamus, dem zentralnervösen Fresszentrum, führt. Diese dehnungsinduzierten Sättigungssignale werden über neurale Mechanismen (afferente Vagusfasern) zum Gehirn (insbesondere Hypothalamus) übertragen. Gleichwohl ist die langfristige Körpergewichtsregulation, zumindest bei Ratten und bei Hunden, nicht von der Intaktheit der vagalen Afferenzen abhängig, da die bilaterale afferente Vagotomie das Fressverhalten und die Gewichtszunahme von Ratten über einen Beobachtungszeitraum von 10 Wochen praktisch nicht beeinflusst (88) (53).

Der Verlust an neural vermittelten Sättigungssignalen wird offensichtlich durch hormonale Faktoren ausgeglichen.

Dass hormonelle Faktoren an Sättigungssignalen mitbeteiligt sind, konnten Davis und Gallagher in ihren Versuchen mit Ratten bestätigen. Sie zeigten, dass wenn Blut gesättigter Ratten in hungrige Ratten transfundiert wurde, diese weniger Nahrung zu sich nahmen (22), (21).

Als Sättigungshormone wurden Cholezystokinin (CCK), Glukagon-like Peptide 1 (GLP-1), Gastrin, Somatostatin und Leptin diskutiert.

CCK ist ein zentraler Neurotransmitter und ein peripheres Hormon. Als zentraler Neurotransmitter ist CCK für die Nahrungsaufnahme von Bedeutung, wenn bilaterale Injektionen

an bestimmten hypothalamischen Orten, wie zum Beispiel im Nucleus ventromedialis hypothalami (VMH), durchgeführt werden. An einigen anderen Stellen des Hypothalamus, zum Beispiel im lateralen Hypothalamus (LH), reichten bereits unilaterale Injektionen aus (63) (110) (87). Da man aus der Wirkung exogen applizierter Neuropeptide in einem Kerngebiet nicht direkt auf die Wirkung der in diesem Kerngebiet vorkommenden endogenen Peptide schließen kann, ist die Verfügbarkeit spezifischer Rezeptor-Antagonisten eine zwingende Voraussetzung, um die physiologische Bedeutung der in diesen hypothalamischen Kerngebieten endogen vorkommenden Neuropeptide weiter evaluieren zu können. Solche Rezeptorantagonisten werden zunehmend verfügbar.

Als intestinales Hormon wurde CCK lange Zeit als Sättigungshormon favorisiert. Nach parenteraler (s.c. oder i.v.) Gabe hemmt es die Nahrungsaufnahme. Allerdings waren Gaben in unphysiologisch hohen Dosen notwendig. Studien mit physiologischer Applikation von CCK zeigten keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme (71) (79).

Für CCK konnte gezeigt werden, dass endogenes CCK im Bereich des LH nach Gabe einer intragastralen Testmahlzeit nicht nur freigesetzt wird (89), sondern dass die Unterdrückung der physiologischen Wirkung (nämlich Suppression von Sättigungssignalen) durch spezifische Rezeptorblockade zu einer Steigerung der konsumierten Futtermenge führt (94).

Ähnlich verhält es sich beim GLP-1. Es kommt zentral sowie peripher vor. Zentral liegen weit höhere Konzentrationen vor als peripher. Studien haben gezeigt, dass unter GLP-1 Infusion die Nahrungsaufnahme verringert wurde (39) (45). Dies waren jedoch wieder unphysiologisch hohe Konzentrationen. Diese Studien belegen eine mögliche pharmakologische Verwendbarkeit von GLP-1 in der Adipositas therapie, während der Beweis für eine physiologische Bedeutung von intestinal freigesetztem GLP-1 aussteht. Eine Elimination des GLP-1 Rezeptors führt zwar zu einer Abschwächung der postprandialen Insulinfreisetzung, hat aber keinen Einfluß auf Nahrungsaufnahme und Gewichtsverhalten (101).

Die Sättigungssignale des Menschen gehen hauptsächlich vom Magen aus. Deshalb sind die Hormone Gastrin und Somatostatin, die beide vom Magen aus sezerniert werden, von

besonderem Interesse (99). Die Infusion von synthetischem, humanem Gastrin-17 hat in einer Infusionsrate, die postprandiale Gastrin-Spiegel imitiert, keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme von Probanden. Auch supraphysiologische Gastrin-Dosierungen sind ineffektiv (95).

Intravenös infundiertes Somatostatin hat in physiologischen Dosierungen ebenfalls keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme beim Menschen (98).

Leptin ist ein vom Fettgewebe synthetisiertes Hormon. Es wird vom Lep-Gen kodiert (125). Tiere, die aufgrund eines Lep-Gendefektes einen Leptinmangel aufweisen (ob/ob-Mäuse), sind übergewichtig. Wird ihnen synthetisches Leptin intracerebroventrikulär appliziert, so führt dies zur Hemmung der Nahrungsaufnahme und somit zur Gewichtsnormalisierung (46) (74). Bei normalgewichtigen Tieren ist dieser Effekt nicht nachzuweisen. Bei übergewichtigen Menschen ist keine generelle Leptindefizienz aufgrund eines Leptin-Gendefektes gegeben (58) (63). Bei den meisten Übergewichtigen sind vielmehr die Plasma-Leptinspiegel erhöht (81).

Nach Nahrungsaufnahme steigen die Leptinspiegel im Plasma nicht an, deswegen hat dieses Hormon auf die akute Regulation der Sättigung und Energieaufnahme keinen direkten Einfluß. Es kann nur als tonischer Regulator die Aktivität der akuten Sättigungsmechanismen modifizieren. Im Gehirn kommen die Rezeptoren für Leptin hauptsächlich im Hypothalamus vor (17) (15). Eine zentrale Applikation von Leptin bei Nagetieren führt zu einer stärkeren anorektischen Wirkung als eine periphere (13). Bei Mäusen mit funktionsuntüchtigem Leptinrezeptor, bei diabetischen db/db-Mäusen, fällt eine gesteigerte Nahrungsaufnahme bei ansteigender Leptinsekretion auf (16). Ein solcher Rezeptordefekt ist jedoch bei Menschen bisher noch nicht beschrieben.

Die Regulation der Nahrungsaufnahme erfolgt durch eine übergeordnete Koordination über das ZNS von efferenten Fasern. Dies geschieht durch Kontrolle des Appetits und der Nahrungsaufnahme, die durch ein komplexes zentrales Regelsystem im medialen und basalen Hypothalamus kontrolliert wird. Dieser Regelkreis umfasst sowohl anorektische- Appetit hemmende- und orektische- Appetit stimulierende Prinzipien.

Dies geht auf eine Reihe von heutzutage als klassisch einzustufenden Experimenten der 40er Jahre zurück (47). In diesen Versuchen wurde nachgewiesen, dass im Nukleus ventromedialis hypothalami (VMH) neuronale Systeme lokalisiert sind, die für das Sättigungsverhalten von Bedeutung sind, wohingegen im lateralen Hypothalamus (LH) das Fressverhalten reguliert wird. In anderen hypothalamischen Kerngebieten, wie dem paraventriculären Nukleus (PVN) wurden auch Neurotransmitter und Neuropeptide identifiziert, die das Nahrungsaufnahmeverhalten beeinflussen können (Serotonin, Noradrenalin, Dopamin, GABA, Galanin, Neuropeptid Y,...).

Generell inhibieren die Neurotransmitter wie Serotonin, CCK, Bombesin, VIP, GLP-1 und TRH die Nahrungsaufnahme in allen drei Kerngebieten (VMH, LH, PVN). Man konnte jedoch feststellen, dass unterschiedliche Wirkungen erzielt wurden, je nachdem, ob der Neurotransmitter in den LH oder VMH injiziert wurde (64) (97).

Zum Beispiel hemmt Noradrenalin die Nahrungsaufnahme, wenn er in den LH injiziert wird, steigert sie jedoch bei Injektionen in den VMH und PVN.

Unter den Neuropeptiden ist eine grosse Anzahl inhibierend sowie stimulierend wirksam.

Stimulierend wirken endogene Opiode, Galanin und das Neuropeptid Y. Galanin steigert vorwiegend die Fettaufnahme (111), Neuropeptid Y eher die Kohlenhydratzufuhr (109).

In Untersuchungen der Arbeitsgruppe Schick, Erdmann, Schusdziarra konnte festgestellt werden, dass Neuropeptid Y Sättigungssignale hemmt, während Galanin und Ghrelin eine aktive Stimulation des Fressverhaltens bewirken, jedoch die Sättigung nicht beeinflussen.

Die permanente Ausschaltung einzelner Neuropeptide führt zu keiner Veränderung von Nahrungsaufnahme und Gewicht (101).

Dies deutet auf ein gut kompensiertes Netzwerk hin.

Es gibt auch extrahypothalamische Areale, die für die Regulation des Fressverhaltens von Bedeutung sind. So übt CCK zum Beispiel seinen hemmenden Effekt auf die Nahrungsaufnahme von Ratten nicht nur im LH, sondern auch in der lateralen Medulla oblongata und im medialen Pons aus (87). Im Bereich der lateralen Medulla oblongata ist der Nucleus tractus solitarii als Terminationsgebiet afferenter Vagusfasern mit grosser Wahrscheinlichkeit an der gastral-hypothalamischen

Übermittlung von Sättigungssignalen beteiligt; die mediale Pons ist als Relaisstation für aufsteigende Bahnen vom Nucleus tractus solitarius zum Hypothalamus anzusehen (87).

Darüber hinaus existieren zahlreiche Faserverbindungen zwischen der Amygdala und dem Hypothalamus, und in der Tat beeinflussen manche Neuropeptide, wie z. B. Bombesin, die Futteraufnahme auch nach Injektion in die Amygdala (56).

Die orektischen Neurotransmitter werden unter anderem durch das vom Magen freigesetzte Ghrelin stimuliert.

## **5. Spezielle Diskussion**

### **5.1. Ghrelin**

Ghrelin ist ein neu entdecktes Hormon mit 28 Aminosäuren, das zunächst im Ratten- und menschlichen Magen identifiziert wurde. Zwischen Ratten- und Menschenghrelin sind keine Unterschiede, bis auf zwei Aminosäuren (52). Es wurde gezeigt, dass sich Ghrelin in den endokrinen X/A-Zellen, heute als Gr-Zellen bekannt, des Magens bis zum Colon befindet (83)(19). Die höchste Konzentration wurde in den oxyntischen Drüsen des Magenfundus gefunden (52) (83) (19)(49). Gastrektomie verringert die Ghrelin Plasmaspiegel um 65-80% (27) (3).

Ghrelin ist ein Hormon, das die Nahrungsaufnahme bei Nagetieren (69) (121) (114) (4) (122) und Menschen (120) fördert. Zugeführt wurde Ghrelin zentral oder peripher. Andererseits verändern sich die Ghrelinspiegel während der Nahrungsaufnahme. Der Plasmaghrelinspiegel sinkt schnell nach kohlenhydratreicher Nahrungsaufnahme ab. Anschliessend steigen die Werte wieder in den Basalwertbereich (114) (103) (18) (115). Das verstärkt die Annahme, dass Ghrelin die Regulation von Appetit und Sättigung reguliert. Auch Eiweissaufnahme stimuliert die Ghrelinfreisetzung beim Menschen (34).

Die Mechanismen, die den Ghrelin-Plasmaspiegel regulieren, sind grösstenteils noch unbekannt. Auf die Nahrungsaufnahme bezogene Mechanismen scheinen relevant zu sein, weil Magendehnung alleine keinen Effekt zeigt (114) (103) (34). In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass gastrointestinale und pankreatische Hormone, die während der

Nahrungsaufnahme stimuliert werden, mitverantwortlich für die postprandiale Ghrelinreduktion sind. Die entgegengesetzte Beziehung von Insulin und Ghrelin, die nach kohlenhydratreicher Nahrungsaufnahme einsetzt, lässt auf eine enge Interaktion schließen. Dies wurde in drei Studien belegt, in denen gezeigt wird, dass ein physiologischer Anstieg von Insulin im Plasma eine Abnahme von Ghrelin zur Folge hat (38) (82) (62). Jedoch konnten zwei weitere Studien dies nicht belegen (12) (85). Der Grund für diese Unstimmigkeit ist nicht klar.

Demzufolge war es von Interesse, die Effekte des Gastric Inhibitory Peptides (GIP), einer Hyper-/Hypoglykämie und Cholecystokinin (CCK) auf Ghrelin zu bestimmen.

### 5.1.2 Nervus Vagus und Ghrelin

Vagale Mechanismen sind von Interesse, weil herausgefunden wurde, dass vagale Fasern die biologischen Veränderungen des Ghrelins in Bezug auf die Nahrungsaufnahme beeinflussen. (20) Das erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass vagale Nerven bei der Regulation von Ghrelinsekretion und -aktion eine Rolle spielen. Diese These wird unterstützt von Lee et al. (57), die gezeigt hat, dass in Ratten, zwei Wochen nach trunkaler Vagotomie, eine Erhöhung des Plasmaghrelins erfolgte. Dies legt nahe, dass Ghrelin vagal inhibiert wird. Andererseits hat die cervikale Vagusstimulation keinen Effekt auf Ghrelin. Gezeigt wurde dies von Murakami et al. (66).

Unerwarteterweise wurde eine erhöhte Ghrelinsekretion bei isoliertem Magen, die von der Frequenz unabhängig war, festgestellt. Wahrscheinlich wird der vagale Effekt in vivo von anderen unbekanntem Faktoren maskiert.

## 5.2 Cholecystokinin in Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme und Ghrelin

### 5.2.1. Struktur und Vorkommen des Cholecystokinins (CCK)

Cholecystokinin wurde ursprünglich aus dem Schweinedarm als ein 33-Aminosäurepeptid isoliert. Es bewirkt neben der Gallenblasenkontraktion auch eine Stimulierung der pankreatischen Enzymsekretion. Dies wurde ursprünglich einer

anderen Substanz zugeschrieben, dem Pankreozymin (PZ) (67) (68). Cholecystokinin war der Name, der zuerst benutzt wurde. Geläufig ist jedoch auch Cholecystokinin- Pancreozymin (CCK-PZ). Neben der Struktur mit 33 Aminosäuren konnten auch mehrere andere Formen des Cholecystokinin isoliert werden. Der Magen-Darm-Trakt enthält auch CCK mit 39 und 58 Aminosäuren (35) (68). Eine kleinere Form, das CCK-Octapeptid, konnte aus dem Darm sowie aus Schaf- und menschlichem Gehirn isoliert werden (26) (77).

CCK kommt peripher und intracerebral vor. Grosse Mengen von CCK- Immunreaktivität konnten in der Mukosa des Duodenums und Jejunums ausgemacht werden (78).

CCK und Gastrin haben einige gemeinsame Eigenschaften. Beide besitzen ein terminales Carboxylpentapeptid, das auch die biologisch aktive Region ist. Die nachfolgende Sequenz von sechs Aminosäuren ist im humanen Gastrin und CCK identisch (5) (32).

#### 5.2.2 Effekte des CCK

Wiederholte Injektionen mit CCK-Analoga, besonders in Kombination mit Sekretin, erhöhen die Masse an Pankreas, DNA, RNA und Proteinen in Ratten (40) (75).

CCK hat ein weites Spektrum auf die glatte Muskulatur des Gastrointestinaltraktes, durch direkte sowie neurale Wirkung. Es relaxiert den unteren Ösophagus sphinkter und es wurde gezeigt, dass es die kontrahierende Wirkung des Gastrins in vitro antagonisiert (37)(80). CCK ist zudem ein grösserer Inhibitor der Magenentleerung für Lipide als Gastrin. Dieser Effekt kann als physiologisch angesehen werden, da schon submaximale Konzentrationen dieses bewirken (23).

Somatostatin des Pankreas wird durch CCK freigesetzt (50).

Aufgenommenes Fett erzeugt über CCK eine Kontraktion der Gallenblase und die Freisetzung pankreatischer Enzyme (119).

#### 5.2.3 CCK und Ghrelin

Die Versuche mit verschiedenen Konzentrationen von CCK bewirkten keine signifikante Hemmung oder Veränderung der Ghrelinausschüttung.

Damit ist CCK kein guter Kandidat für die in vivo beobachtete postprandiale Hemmung der Ghrelinsekretion. Allerdings müssen zur endgültigen Klärung dieser Frage noch entsprechende in vivo Experimente durchgeführt werden.

### 5.3 Bedeutung des GIP

#### 5.3.1 Struktur

Das Gastric inhibitory polypeptide (GIP) wurde von Brown und seinen Mitarbeitern isoliert (8). Entdeckt wurde es durch seine hemmende Wirkung auf die Säuresekretion gastrischer, denervierter Zellen während Pentagastrinstimulation. Die vollständige Aminosäure-sequenz wurde 1971 publiziert (9), (6). GIP ist eine lineare Kette, die 42 Aminosäurereste enthält. Seine Struktur ist dem des Schweineglukagons und Schweinesekretins ähnlich.

#### 5.3.2 Lokalisation und Ausschüttung

Die höchste Konzentration an aktivem GIP wurde im Duodenum und Jejunum gefunden, weniger war im Magenantrum und Ileum nachweisbar. GIP ohne wahrnehmbare Aktivität kommt im Ösophagus, Magenfundus, Kolon, Pankreas oder Leber vor (70) (76).

Studien haben gezeigt, dass GIP in den K-Zellen des Dünndarms von Hunden, Schweinen und Menschen vorkommt (11).

Diese Zellen sind reichlich in den Villi und oberen Krypten enthalten (10). Es gibt auch einige immunzytochemische Nachweise, dass die alpha-Zellen des Pankreas und glukagonhaltige Zellen des Darmes auch ein Peptid enthalten, das eine ähnliche Immunreaktivität zeigt wie GIP (1) (107).

Oral aufgenommene, jedoch nicht intravenös verabreichte Glukose (14), Fett (36) und intraduodenale Aminosäuren (113) stimulieren die GIP- Ausschüttung. Versuche mit verschiedenen Aminosäuren zeigten, dass nicht alle Aminosäuren eine signifikante GIP Ausschüttung bewirken. (112). Diese Studie lässt darauf schließen, dass die GIP Ausschüttung von den Aminosäuren stimuliert wird, die auch auf Gastrin, CCK und das pankreatische Polypeptid erhöhend wirken. Es ist möglich, dass die durch Nahrung stimulierte Ausschüttung von GIP auch durch

andere gastrointestinale oder pankreatische Hormone beeinflusst wird.

Exogenes Glukagon erniedrigt die Konzentration an GIP im Serum auch nach Testmahlzeiten (31).

Exogenes Insulin verhindert die GIP-Antwort auf oral eingenommenes Fett (6), und eine ähnliche Hemmung konnte nach intravenös applizierter Glukose beobachtet werden (30). Die gleichzeitige Infusion von Glukose und Insulin, zeigte keine Wirkung auf GIP (102). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Glukose hauptsächlich die GIP-Ausschüttung im menschlichen Duodenum und Fett die des Jejunums erhöht (86).

### 5.3.3 Biologische Wirkung

Die wichtigsten gastrointestinale Effekte von GIP sind die Hemmung der Magensäuresekretion und Stimulierung von Insulin (7) (6). GIP ist ein potenter Hemmstoff der durch Pentagastrin stimulierten Säure, und der Pepsinsekretion vagal denervierter Magentaschen. Ebenso ist es ein weniger starker Hemmstoff der durch Histamin stimulierten Sekretion (73). GIP in hoher Konzentration ist auch in der Lage, die Säureausscheidung des innervierten Magens zu hemmen, die durch die von Insulin verursachte Hypoglykämie hervorgerufen wird.

Es wurde gezeigt, dass Fett die GIP-Sekretion erhöht. Deshalb wurde angenommen, dass GIP einer der wichtigsten Faktoren ist, der die Säuresekretion nach fetthaltiger Nahrung bei Menschen und Tieren hemmt. Neuere Studien zeigten jedoch, dass GIP diese Rolle nicht einnimmt. Bei menschlichen Versuchspersonen mit gesunden Mägen verursachte GIP intravenös verabreicht erst dann eine leichte Hemmung der pentagastrin-vermittelten Säuresekretion, wenn die Konzentration im Blut weit höher war als jene nach physiologischer Nahrungs- oder Fettaufnahme (59). Vagotomierte Versuchspersonen hatten keine grössere Ausschüttung an GIP als jene mit einem intakten Vagus (104).

Andere gastrointestinale Effekte beinhalten die Hemmung der Magenmotorik bei Hunden (6), die Hemmung des basalen und Pentagastrin vermittelten Druckes des unteren ösophagalen Sphinkters bei Katzen (105) und geringere Natriumverschiebung von luminal nach intestinal bei Speicheldrüsen von Kaninchen (24). Manche dieser Effekte können zurückzuführen sein auf die Verunreinigung des natürlichen GIP durch CCK (51)(60)(65).

Ein anderer wichtiger biologischer Effekt von GIP ist die Erhöhung der pankreatischen Insulinsekretion unter hyperglykämischen Bedingungen. (6). Unter hyperglykämischen Bedingungen von 125 mg/dl und oraler Verabreichung von Glukose, führte dies zu einer gleichzeitigen Erhöhung von Plasma-GIP und Insulin (2). Aus weiteren Versuchen wurde erkannt, dass der durch Glukose stimulierte, die Insulinfreisetzung erhöhende Effekt abhängig von einem gewissen hyperglykämischen Spiegel ist. Exogen verabreichtes Insulin unterdrückte diesen Effekt nicht. Ähnliche Versuche wurden unter hyper-, normo- und hypoglykämischen Bedingungen durchgeführt, während die GIP-Sekretion durch Fett, C-Peptid und Glukagon stimuliert wurde. Es wurde festgestellt, dass die Insulinkonzentration nur unter hyperglykämischen Bedingungen anstieg (116).

GIP stimuliert auch, in Abhängigkeit von hyperglykämischen Bedingungen, die Insulinfreisetzung aus isoliertem Pankreas (73). Genauso wurde herausgefunden, dass im isolierten Pankreas von Ratten GIP die Ausschüttung von immunreaktivem Glukagon stimuliert, wenn die Glukosekonzentration unter 5,5 mM besteht. Eine ähnliche Reaktion konnte auch bei isolierten Langerhans'schen Inseln beobachtet werden (41). 1977 entdeckte die Arbeitsgruppe um Ipp, dass hohe Konzentrationen von GIP auch die Somatostatinausschüttung an isoliertem Hundepankreas stimulieren (50).

Ähnlich wie GLP-1 erhöht GIP nicht nur die Glukose-induzierte Insulinsekretion (29) sondern stimuliert auch die Somatostatinsekretion (61).

#### 5.3.4 GIP und Ghrelin

Im Gegensatz zum GLP-1, stimuliert GIP die Ghrelinsekretion im isolierten Rattenmagen mit und ohne vagaler Vorstimulation.

Aufgrund seines stimulierenden Effektes, könnte GIP der auslösende Faktor der Ghrelinerhöhung nach proteinreicher Nahrung sein. Dies bleibt aber umstritten, weil GIP beim Menschen nach proteinreicher Nahrung nicht signifikant ansteigt (33) (84).

Der Effekt von GIP ist auch erst in höheren Konzentrationen aufgetreten, die so in vivo nicht vorkommen. Dies schliesst jedoch nicht die potentielle Relevanz aus, weil die Sensitivität in

den in vitro Versuchen geringer war. Dasselbe gilt auch für die anderen Versuche mit CCK.

## **6. Zusammenfassung**

Früher war es wichtig, ausreichend zu essen, um zu überleben. Heutzutage hat sich die Problematik grundlegend gewandelt:

Der allgemeine Kalorienbedarf ist insgesamt gesunken wohingegen die Nahrungsaufnahme gleichgeblieben bzw. teilweise sogar gestiegen ist. Die Konsequenzen zeigen sich in der immensen Zunahme der Adipositas in den Industriestaaten und ihren damit verbundenen Folgeerkrankungen, welche zunehmend therapiert werden müssen.

Dazu ist eine genaue Kenntnis der Regulation der Nahrungsaufnahme nötig. Es spielen neuronale sowie hormonelle Faktoren eine Rolle, die sich gegenseitig ergänzen.

Erst 1999 gelang es einer japanischen Forschergruppe durch Zufall einen unbekanntem, endogenen Liganden des Growth-hormone-secretagogue-Rezeptors (GHS-R) zu separieren. Es zeigte sich, dass dieses, aus 28 Aminosäuren bestehende Hormon Ghrelin, hauptsächlich vom Magen sezerniert wird. Neben Stimulierung des Wachstumshormones zeigte sich bei exogener Zufuhr bei Nagetieren auch eine Gewichtszunahme. Damit stellte sich die Frage, wie Ghrelin in den Informationsweg vom Magen an den Hypothalamus eingreift, und welche Substanzen hemmend oder stimulierend auf dessen Ausschüttung wirken.

Die Wirkung von Ghrelin auf die verschiedenen Organsysteme wurde bereits in vielen wissenschaftlichen Publikationen untersucht. Wie jedoch die Ausschüttung von Ghrelin geregelt wird, ist bislang noch ungeklärt. Dies ist in Bezug auf ein Verständnis der physiologischen Regulation der Nahrungsaufnahme und einer möglichen therapeutischen Nutzung von Interesse.

Im Hinblick auf diese Problematik wird in dieser Arbeit auf mögliche Faktoren eingegangen, die die Sekretion beziehungsweise Hemmung von Ghrelin bewirken.

Hierbei wurde die Wirkung von Vagusstimulation, CCK und GIP

in verschiedenen Konzentrationen auf Ghrelin untersucht. Dazu wurden in vitro Versuche am isolierten Rattenmagen durchgeführt.

Ziel der Präparation war es, den Magen über einen in den Truncus coeliacus implantierten Katheter selektiv mit physiologischem Krebs-Ringer-Puffer zu perfundieren. Diesem Puffer wurden zusätzlich verschiedene Konzentrationen von CCK, GIP und Glukose beigefügt. Gleichzeitig wurde das Magenperfusat über einen in die V. portae implantierten Katheter in jeweils vorgeschriebenen Zeiträumen gesammelt und über Radioimmunoassay ausgewertet.

Die Ergebnisse dieser in vitro Versuche zeigten, dass CCK-Oktapeptid, CCK-Nonapeptid, Glukose und GIP in niedriger Konzentration keinen signifikanten Einfluss auf die Ghrelinsekretion bewirken.

Bei GIP-Konzentrationen in Höhe von  $10^{-8}M$  und  $10^{-7}M$  wurden signifikante Erhöhungen der Ghrelinsekretion festgestellt.

Zusammenfassend kann folgende Schlussfolgerung gezogen werden:

In vitro zeigte GIP ab einer Konzentration von  $10^{-8}M$  eine stimulierende Wirkung auf Ghrelin. CCK und Hyperglykämie ergaben keine signifikanten Änderungen der Ghrelinsekretion.

Somit hat GIP eine entgegengesetzte Wirkung auf die Ghrelinsekretion im Vergleich zu zahlreichen anderen gastrointestinalen Hormonen (Gastrin, Somatostatin, GLP-1, Insulin), die alle hemmend wirken.

Aufgrund seines stimulierenden Effektes, könnte GIP der auslösende Faktor der Ghrelinrhöpfung nach proteinreicher Nahrung sein. Dies bleibt aber umstritten, weil GIP beim Menschen nach proteinreicher Nahrung nicht signifikant ansteigt. Für die Zukunft könnte Ghrelin als Appetitstimulus von Interessen bei bestimmten Erkrankungen, wie zum Beispiel bei Anorexie, Tumorkachexie oder Gastrektomie sein.

Ob die Adipositas therapie mit Ghrelinantagonisten beeinflusst werden kann ist ungewiss, da der Einfluss von Ghrelin durch viele weitere appetitstimulierende Faktoren kompensiert werden kann.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Aluments, J., R. Hakanson, T. O'Dorisio, K. Sjolund, F. Sundler: Is GIP a glucagon cell constituent? *Histochemistry* 58, 253-257 (1979)
2. Anderson, D., D. Elahi, J. Brown, J. Tobin, R. Andres: Oral glucose augmentation of insulin secretion. Interactions of gastric inhibitory polypeptide with ambient glucose and insulin levels. *J. Clin. Invest.* 62, 152-161 (1978)
3. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T: Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4753-8
4. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimya M, Nijima A, Fujino MA, Kasuga M: Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001; 120:337-45
5. Bradbury, A., M. Finnie, D. Smyth: Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes. *Nature*, 298:686-688 (1982)
6. Brown, J., J. Dryburgh, S. Ross, J. Dupre: Identification and actions of gastric inhibitory polypeptide. *Recent Prog. Horm. Res.* 31, 487-532 (1975)
7. Brown, J., M. Dahl, S. Kwauk, C. McIntosh, S. Otte, R. Pederson: Actions of GIP. *Peptides*, 2 (Suppl. 2):241-245 (1981)
8. Brown, J., V. Mutt, R. Pederson: Further purification of a polypeptide demonstrating enterogastrone activity. *J Physiol. (lond.)*, 209, 57-64 (1970)
9. Brown, J.: A gastric inhibitory polypeptide. I. The amino acid composition and the tryptic peptides. *Can. J. Biochem.* 49, 255-261 (1971)
10. Buchan, A., J. Polak, C. Capella, E. Solcia, A. Pearse: Electroimmunocytochemical evidence for the K cell localisation of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in man. *Histochemistry* 56, 37-44 (1978)
11. Buffa, R., J. Polak, A. Pearse, E. Solcia, L. Grimelius, C. Capella: Identification of the intestinal cell storing gastric inhibitory peptide. *Histochemistry* 43, 249-255 (1975)
12. Caixas A, Bashore C, Nash W, Pi-Sunyer F, Laferre B. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1902-6
13. Campfield, L.A., F.J. Smith, Y. Guisez, R. Devos, P. Burn: Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linkig adiposity and entral neural networks. *Science* 269 (1995) 546-549
14. Cataland, S., S. Crockett, J. Brown, E. Mazzaferri: Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulation by oral glucose in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39, 223-228 (1974)
15. Cohen, B., D. Novick, M. Rubinstein: Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 274 (1996) 1185-1188
16. Coleman, D.L.: Obese and diabetes: Two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14 (1978) 141-148
17. Considine, R.V., E.L. Considine, C.J. Williams, T.M. Hyde, J.F. Caro: The hypothalamic leptin receptor in humans. Identification of incidental sequence polymorphism and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes* 19 (1996) 992-994

18. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50:1714-9
19. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal M, Saganuma 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* 2000; 141:4255-61
20. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijjama A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M: The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002;123:1120-8
21. Davis, J.D., R.L. Gallagher, R.F. Ladove, A.J. Turausky: Inhibition of food intake by a humoral factor. *J Comp Physiol Psychol* 67 (1969) 407-414
22. Davis, J.D., R.L. Gallagher, R.F. Ladove: Food intake controlled by a blood factor. *Science* 156 (1967) 1247- 1248
23. Debas H., Farooq O., Grossman M.: Inhibition of gastric emptying is a physiological action of cholecystokinin. *Gastroenterology* 1975; 68:1211-1217
24. Denniss, A., J. Young: Modification of salivary duct electrolyte transport in rat and rabbit by physalaemin, VIP, GIP and other enterohormones. *Pflugers Arch.* 376:73-80 (1978).
25. Deutsch, J.A., W.G. Young, T.J. Kalogern: The stomach signals satiety. *Science* 201; 165-167 (1978)
26. Dockray, G.: Immunoreactive component resembling cholecystokinin octapeptide in intestine. *Nature*, 270:357-361 (1977)
27. Dornoville de la Cour C, Bjorkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, Hakanson R : A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept* 2001; 99:141-50
28. Dourish, C.T., W. Rycroft, D. Iversen: Postponement of satiety by blockade of brain cholecystokinin (CCK- B) receptors. *Science* 245 (1989) 1509- 1511
29. Dupre J, Ross SA, Watson D, Brown JC. Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1973;37:826-8
30. Ebert, R., K. Illmer, W. Creutzfeldt: Release of gastric inhibitory polypeptide (GIP) by intraduodenal acidification in rats and humans and abolishment of the incretin effect of acid by GIP-antiserum in rats. *Gastroenterology* 76, 515-523 (1979)
31. Ebert, R., W. Creutzfeldt, J. Brown, H. Frerichs, R. Arnold: Response of gastric inhibitory polypeptide (GIP) to test meal in chronic pancreatitis- Relationship to endocrine and exocrine insufficiency. *Diabetologia* 12, 609-612 (1976)
32. Eipper, B., A. Myers, R. Mains: Peptidyl-glycine amidation activity in tissues and serum of the adult rat. *Endocrinology*, 116:2497-2504 (1985)
33. Elliott RM, Morgan LM, Tredger JA, Deacon S, Wright J, Marks V. Glucagon-like peptide-1 (7-36)amide and glucose-dependant insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol* 1993; 138:159-66
34. Erdman J, Lippl F, Schusdziarra V. Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regul Pept* 2003; 116:101-7
35. Eysselein, V. E., J. Jr. Reeve, J. Shively, D. Hawke, J. Walsh: Partial structure of a large canine cholecystokinin (CCK58) : Amino acid sequence. *Peptides*, 3:687-691 (1982)
36. Falko, J., S. Crockett, S. Cataland, E. Mazzaferri: Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulated by fat ingestion in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41, 260-265 (1975)

37. Fisher, R., DiMarino A., Cohen S.: Mechanism of cholecystokinin inhibition of lower esophageal sphincter pressure. *Am. J. Physiol.* 1975; 228:1469
38. Flanagan DE, Evans ML, Monsod TP, Rife F, Heptulla RA, Tamborlane WV, Sherwin RS: The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 286:E313-6
39. Flint, A., A. Raben, A. Astrup, J.J. Holst: Glucagon- like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest* 101 (1998) 515-520
40. Folsch, U., Winckler, K., Wormsley, K.: Influence of repeated administration of cholecystokinin and secretin on the pancreas of the rat. *Scand. J. Gastroenterol.*, 13:663-671 (1978)
41. Fujimoto, W., R. Williams, J. Ensink: Gastric inhibitory polypeptide, cholecystokinin, and secretin effects on insulin and glucagons secretion by islet cultures (40448). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 160, 349-353 (1979)
42. Geliebter, A.: Gastric distension and gastric capacity in relation to food intake in humans. *Physiol Behav* 44 (1988) 665- 668
43. Gibbs, J.; J.D. Falasco: Sham feeding in the rhesus monkey. *Physiol Behav.* 1978
44. Gonzales, M.F., J.A. Deutsch: Vagotomy abolishes cues of satiety produced by gastric distension. *Science* 212 (1981) 1283- 1284
45. Gutzwiller, J.P., B. Göke, J. Drewe, P. Hildebrand, S. Ketterer, D. Handschin, R. Winterhalder, D. Conen, C. Beglinger: Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of fod in-take in humans. *Gut* 44 (1999) 81-86
46. Halaas, J.L., K.S. Gajiwela, M. Maffei, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM: Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269 (1995) 543-546
47. Hetherington, A.W., S.W. Ranson: Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec* 78 (1940) 149-172
48. Hofmann, H.H., H. Schnitzlein: The number of vagus nerves in man. *Anat Rec* 139 (1969) 429- 435
49. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K.: Ghrelin and des-acyl gherlin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279:909-13
50. Ipp, E., R. Dobbs, V. Harris, A. Arimura, W. Vale, R. Unger: The effects of gastrin, gastric inhibitory polypeptide, secretin, and the octapeptide of cholecystokinin upon immunoreactive somatostatin release by the perfused canine pancreas. *J. Clin. Invest.* 60:1216-1219 (1977)
51. Jensen, R., G. Lemp, M. Beinfeld, J. Gardner: Actions of natural gastric inhibitory peptide on pancreatic acinar cells: Due to contamination with cholecystokinin. *Gastroenterology* 82, 20-25 (1982)
52. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K., Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402:656-60
53. Koopmans, H.S.: A stomach hormone that inhibits food intake. *J Auton Nerv Syst* 9 (1983) 157.171
54. Kraly, F.S., G.P. Smith: Combined pregastric and gastric stimulation by food is sufficient for normal meal size. *Physiol Behav* 21 (1978) 405-408
55. Kraly, F.S., W.J. Carty, G.P. Smith: Effect of pregastric food stimuli on meal size and intermeal interval in the rat. *Physiol Behav* 20 (1978) 779-784
56. Kyrkouli, S.E., B.G. Stanley, S.F. Leibowitz: Bombesin- induced anorexia: sites of action in the brain. *Peptides* 8 (1987) 237-241

57. Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley Jr GH.: Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 2002; 143:185-90
58. Leibel, R.: And finally, genes for human obesity. *Nature genetics* 16 (1997) 218-220
59. Maxwell, V., A. Shulkes, J. Brown, T. Solomon, J. Walsh, M. Grossman: Effect of gastric inhibitory polypeptide on pentagastrin-stimulated acid secretion on man. *Dig. Dis.* 25, 113-116 (1980)
60. Mayer, E., J. Elashoff, V. Mutt, J. Walsh: Reassessment of gastric acid inhibition by cholecystokinin and gastric inhibitory polypeptide in dogs. *Gastroenterology* 83, 1047-1050 (1982)
61. McIntosh CH, Pederson RA, Koop H, Brown JC: Gastric inhibitory polypeptide stimulated secretion of somatostatinlike immunoreactivity from the stomach: inhibition by acetylcholine or vagal stimulation. *Can J Physiol Pharmacol* 1981;59:468-72
62. Mohlig M, Spranger J, Otto B, Ristow M, Tschop M, Pfeiffer AF: Euglycemic hyperinsulinemia, but not lipid infusion, decreases circulating ghrelin levels in humans. *J Endocrinol Invest* 2002; 25:RC36-8
63. Montague, C.T., J.S. Farooqui, J.P. Whitehead, M.A. Soos, H. Rau, N.J. Wareham, C.P. Sewter, J.E. Digby, S.N. Mohammed, J.A. Murst, A.H. Barnett, J.B. Prins, S. O`Rahilly: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387 (1997) 903-908
64. Morley, J.E.: Neuropeptide regulation of appetite and weight. *Endocrine reviews* 8 (1987) 256-287
65. Mueller, M., P. Demol, H. Goebell, G. Fladrich, J. Brown: Natural purified porcine gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulates exocrine pancreas secretion due to contamination with a cholecystokinin-like substances. *Regul. Pept.* 5, 307-315 (1983)
66. Murakami N, Hayashida T, Kuroiwa T, Nakahara K, Ida T, Mondal MS, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K : Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. *J Endocrinol* 2002;174:283-8
67. Mutt, V., E. Jorpes: Hormonal polypeptides of the upper intestine. *Biochem. J.*, 125:57P-58P (1971)
68. Mutt, V., J. Jorpes: Structure of porcine cholecystokinin-pancreozymin. *Eur. J. Biochem.*, 6:156-162 (1968)
69. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S: A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409:194-8
70. O`Dorisio, T., S. Cataland, M. Stevenson, E. Mazzaferri: Gastric inhibitory polypeptide (GIP): Intestinal distribution and stimulation by amino acid and medium chain triglycerides. *Dig. Dis.* 21, 761-765 (1976)
71. Pappas, T.N., R.L. Melendez, K.M. Strah, H.T. Debas: Cholezystokinin is not a peripheral satiety signal in the dog. *AM J Physiol* 249 (1985) G733- 738
72. Pederson, R., J. Brown: Inhibition of histamine-, pentagastrin-, and insulin-stimulated canine gastric secretion by pure "gastric inhibitory polypeptide". *Gastroenterology* 62, 393-400; (1972)
73. Pederson, R., J. Brown: Interaction of gastric inhibitory polypeptide, glucose, and arginine on insulin and glucagons secretion from the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 103:610-615 (1978)
74. Pellemounter, M.A., M.J. Cullen, M.B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone, F. Collins: Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob

- mice. *Science* 269 (1995) 540-543
75. Peterson, H., Solomon, T., Grossmann, M.: Effect of chronic pentagastrin, cholecystokinin, and secretin on pancreas of rats. *Am. J. Physiol.*, 234:E286-E293 (1978)
  76. Polak, J., S. Bloom, M. Kuzio, J. Brown, A. Pearse: Cellular localisation of gastric inhibitory polypeptide in the duodenum and jejunum. *Gut* 14, 284-288 (1973)
  77. Reeve, J. Jr., V. Eysselein, J. Walsh, J. Sankaran, C. Deveney, W. Tourtellotte, C. Miller, J. Shively: Isolation and characterization of biologically active and inactive cholecystokinin-octapeptides from human brain. *Peptides*, 5:959-966 (1984)
  78. Rehfeld J.: Immunochemical studies on cholecystokinin. *J. Biol. Chem.* 1978; 253:4016-4021
  79. Reidelberger, R.D., T.E. Solomon: Comparative effects of CCK- 8 on feeding, sham feeding and exocrine pancreatic secretion in rats. *Am J Physiol* 251 (1986) R97-R105
  80. Resin H., Stern D., Sturdevant R., Isenberg J.: Effect of the C-terminal octapeptide of cholecystokinin on lower esophageal sphincter pressure in man. *Gastroenterology* 1973; 64:946-949
  81. Rosenbaum, M., M. Nicolson, J. Hirsch, S.B. Meymsfield, D. Gallagher, F. Cha, R.L. Leibel: Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (1996) 3424-3427
  82. Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E, Boyadjian R: Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3997-4000
  83. Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T: Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 2002; 23:531-6
  84. Sarson DL, Bryant MG, Bloom SR. A radioimmunoassay of gastric inhibitory polypeptide in human plasma. *J Endocrinol* 1980; 85:487-96
  85. Schaller G, Schmidt A, Pleiner J, Woloszczuk W, Wolztm M, Luger A. Plasma ghrelin concentrations are not regulated by glucose or insulin: a double-blind, placebo-controlled crossover clamp study. *Diabetes* 2003; 52:16-20
  86. Schattenmann, G., R. Ebert, R. Siewert, W. Creutzfeldt: Different response of gastric inhibitory polypeptide to glucose and fat from duodenum and jejunum. *Scand. J. Gastroenterol.* 19, 260-266 (1984)
  87. Schick, R.R., G.J. Harty, T.L. Yaksh, V.L.W. Go: Sites in the brain at which cholecystokinin octapeptide (CCK-8) acts to suppress feeding in rats: a mapping study. *Neuropharmacology* 29 (1990) 109-118
  88. Schick, R.R., S. Samsami, J.P. Zimmermann, T. Eberl, C. Endres, V. Schusdziarra, M. Classen: Effect of galanin and food intake in rats: involvement of lateral and ventromedial hypothalamic sites. *Am J Physiol* 264 (1993) R355-R361
  89. Schick, R.R., T.L. Yaksh, D.R. Roddy, V.L.W. Go: Release of hypothalamic cholecystokinin in cats: effects of nutrient and volume loading. *Am J Physiol* 256 (1989) R248-R254
  90. Schick, R.R., T.L. Yaksh, V.L.W. Go: Intracerebroventricular injections of cholecystokinin octapeptide suppress feeding in rats- pharmacological characterization of this action. *Reg Peptides* 14 (1986) 277- 291
  91. Schick, R.R., T.L. Yaksh, V.L.W. Go: Postprandial release of hypothalamic cholecystokinin (CCK). In: *Brain- Gut Interactions*, Taché, Y.D. Wingate (eds):

- CRC Press, Boca Raton (1991) 267- 278
92. Schick, R.R., T.L. Yaksh, V.W.L. Go: An intragastric meal releases the putative satiety factor cholecystokinin from hypothalamic neurons in cats. *Brain research* 370 (1986) 349- 353
  93. Schick, R.R., V. Schusdziarra, B. Schröder, M. Classen: Effect of intraduodenal or intragastric nutrient infusion on food intake in man. *Z Gastroenterol* 29 (1991) 637- 641
  94. Schick, R.R., V. Schusdziarra, C. Endres, T. Eberl, M. Classen: Putative sleep factors and satiety in rats: Role of cholecystokinin (CCK) and delta sleep inducing peptide (DSIP). *Neuropeptides (Life Sci Adv)* 10 (1991) 41-48
  95. Schick, R.R., V. Schusdziarra: Regulation of food intake. In: Ditschuneit, H., F.A. Gries, H. Hauner, V. Schusdziarra, J.G. Wechsler (eds.): *Obesity in Europe 1993*. John Libbey, London (1994) 335-348
  96. Schick, R.R., W.M. Reilly, D.R. Roddy, T.L. Yaksh, V.L.W. Go: Neuronal cholecystokinin- like immunoreactivity is postprandially released from primate hypothalamus. *Brain Res* 418 (1987) 20- 26
  97. Schusdziarra V, Rouiller D, Harris V, Conlon JM, Unger RH: The response of plasma somatostatin-like immunoreactivity to nutrients in normal and alloxan diabetic dogs. *Endocrinology* 1978;103:2264-2273.
  98. Schusdziarra, V., J. Lawecki, H.H. Ditschuneit, B. Lukas, V. Maier, E.F. Pfeiffer: Effect of low-dose somatostatin infusion on pancreatic and gastric endocrine function in lean and obese nondiabetic human subjects. *Diabetes* 34 (1985) 595-601
  99. Schusdziarra, V.: The physiological role of somatostatin in the regulation of nutrient homeostasis. *Basic and Clinical Aspects of Neuroscience*. Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg 4 (1992) 43-54
  100. Schwartz, G.J., P.R. McHugh, T.H. Moran: Integration of vagal afferent responses to gastric loads and cholecystokinin in rats. *Am J Physiol* 261 (1991) R64- R69
  101. Scrocchi, L.A., T.J. Brown, N. Maclusky, P.L. Brubaker, A.B. Auerbach, A.L. Joyner, D.J. Drucker: Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagons-like peptide 1 receptor gene. *Nat med* 2 (1996) 1254-1258
  102. Service, F., R. Nelson, A. Rubenstein, V. Go: Direct effect of insulin on secretion glucagon, gastric inhibitory polypeptide, and gastrin during maintenance of normoglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 47, 488-493 (1978)
  103. Shiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S : Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:240-4
  104. Simmons, T., I. Taylor, V. Maxwell, J. Brown, M. Grossman: Failure of gastric inhibitory polypeptide to inhibit pentagastrin-stimulated acid secretion in vagotomized human subjects. *Dig. Dis. Sci.* 26, 902-904 (1981)
  105. Sinar, D., T. O'Dorisio, E. Mazzaferri, H. Mekhjan, J. Caldwell, F. Thomas: Effect of gastric inhibitory polypeptide on lower esophageal sphincter pressure in cats. *Gastroenterology* 75, 263-267 (1978)
  106. Smith, E.H., C. Jerome, B.J. Cushin, R. Eterno, K.J. Simansky: Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat. *Science* 213 (1981) 1036- 1037
  107. Smith, P., F. Merchant, D. Johnson, W. Fujimoto, R. Williams: Immunocytochemical localization of a gastric inhibitory polypeptide-like material within A-cells of the endocrine pancreas. *Am. J. Anat.* 149:585-590 (1977)

108. South, E.H., R.C. Ritter: Capsaicin application to central or peripheral vagal fibers attenuates CCK satiety. *Peptides* 9 (1988) 601- 612
109. Stanley, B.G., D.R. Daniel, A.S. Chin, S.F. Leibowitz: Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. *Peptides* 6 (1985) 1205-1211
110. Stern, J.J., C.A. Cudillo, J. Kruper: Ventromedial hypothalamus and short-term feeding suppression in male rats. *J Com Physiol* 90 (1976) 484-490
111. Tempel, D.L., K.J. Leibowitz, S.F. Leibowitz: Effects of PVN galanin on macronutrient selection. *Peptides* 9 (1988) 309-314
112. Thomas, F., D. Sinar, E. Mezzaferri, S. Cataland, H. Mekhjian, J. Caldwell, J. Fromkes: Selective release of gastric inhibitory polypeptide by intraduodenal amino acid perfusion in man. *Gastroenterology* 74: 1261-1265 (1978)
  
113. Thomas, F., E. Mazzaferri, S. Crockett, H. Mekhjian, H. Gruemer, S. Cataland: Stimulation of secretion of gastric inhibitory polypeptide and insulin by intraduodenal amino acid perfusion. *Gastroenterology* 70, 523-527 (1976)
114. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; 407:908-13
115. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingsmaier M, Landgraf R, Folwaczay C: Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 2001; 24:RC19-21
116. Verdonk, C., R. Rizza, R. Nelson, V. Go, J. Gerich, F. Service: Interaction of fat-stimulated gastric inhibitory polypeptide on pancreatic alpha and beta cell function. *J. Clin. Invest.* 65, 1119-1125 (1980)
117. Welch, I.M., C.P. Sepple, N.W. Read: Comparisons of the effects on satiety and eating behaviour of infusion of lipid into the different regions of the small intestine. *Gut* 29 (1988) 306-311
118. Welch, I.M., K. Saunders, N.W. Read: Effect of ileal and intravenous infusions of fat emulsions on feeding and satiety in human volunteers. *Gastroenterology* 89 (1985) 1293- 1297
119. Wiener I., Inoue K., Fagan C., Lilja P., Watson L., Thompson J.: Release of cholecystokinin in man: Correlation of blood levels with gallbladder contraction. *Ann. Surg.* 1981; 194:321-327
120. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR: Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5992
121. Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal L, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR: Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 2001; 50:2540-7
122. Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy K, Dakin C, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DGA, Ghatei MA, Bloom SR: The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 2000; 141:4325-8
123. Young, R.C.; J. Gibbs; J. Antin; J. Holt; GP Smith: Absence of satiety during sham feeding in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1974
124. Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, J.M. Friedman: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372 (1994) 425-432. (Erratum, *Nature* 374 (1995) 479)

## **8. Danksagung**

Ein sehr grosser Dank geht an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. V. Schusdziarra. Er hatte immer Zeit für mich und hat mir sehr geholfen, die schriftliche Arbeit voranzutreiben.

Für den experimentellen Teil meiner Dissertation geht mein besonderer Dank an die „Laborratten“ J. Zimmermann, Andrej und C. Herda, die mir bei den Versuchen immer tapfer zur Seite standen und mich vor einigen verzweifelten Momenten der Beinahekapitulation bewahrt haben. Mein Betreuer Herr Dr. F. Lippl war auch immer sehr zuverlässig während meiner experimentellen Arbeit zu erreichen und hilfsbereit.

Ein grosses Dankeschön geht auch an meine Eltern und meine Schwester, die mich „am Ball“ gehalten haben, dass ich auch die schriftliche Arbeit relativ zügig beenden konnte.