

Klinik für Ernährungsmedizin
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J.J. Hauner)

Einfluss des Nervus vagus und gastrointestinaler Hormone auf die Ghrelinsekretion im Magen der Ratte

Florian David Nikolaus Kircher

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 30.01.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.06.2006 angenommen.

Meinen Eltern

Inhalt

1. Einleitung.....	4
2. Material und Methoden.....	8
2.1. Übersicht.....	8
2.2. Versuchstiere	8
2.3. Präparation.....	9
2.4. Perfusion.....	11
2.5. Versuchsprotokolle	12
2.5.1. Vagusstimulation.....	13
2.5.1.1. Vagusstimulation über 40 Minuten	14
2.5.1.2. Vagusstimulation unter Atropin	15
2.5.2. Gastrointestinale Hormone.....	16
2.5.2.1. Inhibitionsversuche	16
2.5.2.2. Stimulationsversuche.....	17
2.6. Auswertung.....	18
2.6.1. Radioimmunoassay	18
2.6.1.1. Ghrelinbestimmung	19
2.6.2. Statistik	19
3. Ergebnisse.....	20
3.1. Vagusstimulation	20
3.1.1. Vagusstimulation über 40 Minuten	23
3.1.2. Vagusstimulation unter Einfluss von Atropin	24

3.2. Gastrointestinale Hormone	26
3.2.1. Gastrin-17	26
3.2.2. Somatostatin.....	28
3.2.3. Glucagon-like-Peptide-1(7-36)	29
3.2.4. Insulin	30
3.2.5. Neuromedin C	31
4. Allgemeine Diskussion.....	32
4.1. Ghrelin – ein neu entdecktes Hormon.....	32
4.1.1. Isolierung und Historisches.....	32
4.1.2. Struktur und Molekularbiologie.....	33
4.1.3. Ghrelinderivate	34
4.1.4. Des-Gln ¹⁴ -Ghrelin.....	35
4.1.5. Vorkommen und Lokalisation.....	36
4.2. Ghrelinrezeptoren.....	37
4.2.1. Das GHS-R-Gen	37
4.2.2. Subtypen	38
4.2.2.1. GHS-R 1a.....	38
4.2.2.2. GHS-R 1b.....	39
4.3. Wirkungen.....	39
4.3.1. Wirkungen auf das Endokrinium	39
4.3.1.1. Wachstumshormon.....	39
4.3.1.2. Weitere Hypophysenhormone	40
4.3.1.3. Endokrines Pankreas.....	41
4.3.2. Extraendokrine Wirkungen.....	42
4.3.2.1. Verdauungssystem.....	42

4.3.2.2. Kardiovaskuläres System.....	43
4.3.2.3. Tumoren	44
4.3.2.4. Verhalten und Psyche.....	46
4.3.3. Ghrelin und Metabolismus.....	47
4.3.3.1. Energiehomöostase.....	47
4.3.3.2. Regulation des Körpergewichts im ZNS.....	49
4.3.3.3. Ghrelin	51
5. Spezielle Diskussion.....	53
5.1. Allgemeines zur Regulation der Ghrelinsekretion	53
5.2. Nervus vagus und cholinerges System	54
5.3. Gastrin	57
5.4. Somatostatin	58
5.5. Glucagon-like Peptide-1	58
5.6. Insulin.....	60
5.7. Neuromedin C.....	61
6. Zusammenfassung	62
7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	65
8. Abkürzungen.....	69
9. Literaturverzeichnis	72
10. Danksagungen	91

1. Einleitung

Leben ist untrennbar mit Nahrungsaufnahme, Verstoffwechslung und Energiespeicherung verbunden. Darüber hinaus spielt das Essen für den Menschen bis heute auch eine wichtige Rolle im sozialen Leben. Während in der Menschheitsgeschichte über Millionen von Jahren immer ein Nahrungsmangel bestand und somit nach dem Evolutionsprinzip die Aufnahme von möglichst viel Nahrung, die Fähigkeit zur Anlage großer Energiespeicher und ein möglichst sparsamer Verbrauch körpereigener Reserven einen Selektionsvorteil darstellte, sieht sich die Bevölkerung der modernen Industrieländer vor dem Hintergrund eines praktisch unbegrenzten Nahrungsangebotes zunehmend mit den Folgen einer Überernährung konfrontiert. Nachdem lange Zeit Übergewichtigkeit unter ästhetischen und psychologischen Gesichtspunkten diskutiert wurde, rückte in den letzten Jahrzehnten der gesundheitliche Aspekt der Adipositas in den Vordergrund. Vor allem durch große epidemiologische Studien, wie der Framingham-Studie oder der Nurses Health Study wurde der Zusammenhang von Adipositas und ihren zahlreichen Folgekrankheiten, wie beispielsweise Diabetes mellitus oder arterielle Hypertonie, wissenschaftlich erfasst (137,169). Aus volkswirtschaftlicher Sicht stellt die Adipositas ein enormes Problem dar; beispielsweise werden Adipöse doppelt so häufig vorzeitig berentet als Normalgewichtige. Die Kosten für adipositasassoziierte Krankheiten in Deutschland werden auf etwa 15 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt, was 6% aller Gesundheitsausgaben in der Bundesrepublik entsprechen würde (242). Obwohl in den letzten Jahren eine Sensibilisierung sowohl von Ärzten als auch der breiten Öffentlichkeit stattgefunden hat, nehmen Prävalenz und Inzidenz der Adipositas in Deutschland stetig zu (16).

Neben der symptomatischen Therapie der adipositasassoziierten Krankheiten ist unter gesundheitsökonomischen und präventiven Gesichtspunkten, aber auch zur Verbesserung der Lebensqualität der Patienten eine kausale Therapie der Adipositas von herausragender Bedeutung. Die derzeit verfügbaren medikamentösen Therapieansätze sind nicht dauerhaft zufriedenstellend (80,151). Lediglich die chirurgischen Verfahren zeigen sich auch für längere Zeiträume als effektiv, stellen jedoch aufgrund von Invasivität und Risiko des Eingriffs nur in Ausnahmefällen eine Option dar (61,105). Daher ist das Verständnis der Regulation der Nahrungsaufnahme somit nicht nur für die Prävention von Adipositas, sondern auch für die Entwicklung einer effektiven Pharmakotherapie der Adipositas außerordentlich wichtig.

Auf zentralnervöser Ebene stellt der Hypothalamus die zentrale Integrationseinheit für die Regulation der Nahrungsaufnahme dar (25,95). An der Verarbeitung der unterschiedlichen aus der Körperperipherie eintreffenden Signale sind eine Vielzahl unterschiedlicher Transmitter und Neuropeptide beteiligt, deren genaues Zusammenspiel sehr komplex und derzeit nur in Ansätzen verstanden ist.

Ein solches, erst 1994 entdecktes peripheres Signal, das für die Langzeitregulation des Körpergewichts bedeutsam zu sein scheint, stellt das vom Fettgewebe produzierte Hormon Leptin dar (254). Hingegen gelten Magen und Dünndarm schon seit Mitte des letzten Jahrhunderts als Ursprungsort peripherer Sättigungssignale, vor allem im Hinblick auf die Kurzzeitregulation der Nahrungsaufnahme. Beim Menschen und der Ratte kommt dabei in erster Linie dem Magen und weniger dem Dünndarm die entscheidende Rolle zu. Für die Sättigung wichtigster Reiz ist die Dehnung der Magenwand. Neben dem Volumen aber scheint auch die Nährstoffzusammensetzung das Auftreten eines Sättigungsgefühls zu beeinflussen, der Energiegehalt der Nahrung ist dabei jedoch von untergeordneter Bedeutung (235). Die Informationsübertragung vom Magen zum Gehirn erfolgt zum einen durch den Nervus vagus (235), zum anderen ergaben sich in den späten 60er Jahren Hinweise, dass ein weiterer humoraler Faktor existieren müsste: so ließ sich durch Transfusion von Blut gesättigter Ratten eine Reduktion der Nahrungsaufnahme bei hungrigen Ratten beobachten (59). Fernerhin kann ebenfalls bei Ratten die Füllung eines implantierten zweiten Magens, der ja keine neuronale Verbindung zum Wirtsorganismus hat, zur Sättigung führen (123). Die beiden bekannten

gastralen Hormone Gastrin und Somatostatin, die physiologischerweise im Rahmen der Nahrungsaufnahme in die Blutbahn freigesetzt werden, zeigten bei exogener Infusion in natürlich vorkommenden Konzentrationen jedoch keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme, so dass sie als mögliche Kandidaten ausschieden und der postulierte humorale Faktor über viele Jahre unbekannt blieb (235).

Die Entdeckung gelang erst 1999 durch Zufall, als eine japanische Forschergruppe den bislang unbekanntem endogenen Liganden des Growth-hormone-secretagogue-Rezeptors (GHS-R) fand. 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 eines anderen Hormons wirken (120). Es stellte sich heraus, daß das neu entdeckte, aus 28 Aminosäuren bestehende Peptidhormon hauptsächlich vom Magen freigesetzt wird (3). Neben dem stimulierenden Effekt auf die Freisetzung von Wachstumshormon zeigte sich bei exogener Zufuhr eine deutliche Gewichtszunahme bei Nagetieren sowie eine Steigerung des Appetits beim Menschen (53,120,180). Damit könnte Ghrelin ein möglicher Kandidat für den postulierten humoralen Informationsweg vom Magen an den Hypothalamus sein.

Während die Wirkung von Ghrelin auf unterschiedliche Organsysteme Gegenstand vieler wissenschaftlicher Publikationen sind, ist die Regulation der Ghrelinsekretion selbst bislang wenig erforscht. Dies ist jedoch für ein umfassendes Verständnis der physiologischen Funktion und einer möglichen therapeutischen Nutzung des neu entdeckten Hormons unerlässlich. Bekannt ist, dass beim Menschen kohlenhydratreiche Nahrung zum Abfall und proteinreiche Nahrung zum Anstieg der Ghrelinspiegel führen (50,197,226,228). Bei Ratten hingegen scheint eine proteinarme Diät zum Anstieg und eine fetthaltige Diät zum Abfall der Plasmaghrelinkonzentration zu führen (128). Die alleinige Dehnung des Magens hingegen zeigt keine Wirkung (75,197,226). Die für diese nährstoffabhängigen Phänomene verantwortlichen Regulationsmechanismen sind bislang unbekannt, deuten jedoch auf eine komplexe endokrine Steuerung hin.

Im Hinblick auf diese Ergebnisse sollen im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit durch *in vitro* Experimente am isolierten Rattenmagen folgende Fragestellungen geklärt werden:

- 1.) Welchen Einfluss hat die elektrische Stimulation des Nervus vagus in Abhängigkeit von Frequenz und intragastralem pH-Wert auf die Ghrelinfreisetzung?
- 2.) Welchen Anteil trägt die cholinerge Transmission bei der vagal induzierten Stimulation der Ghrelinfreisetzung?
- 3.) Welchen Einfluß haben gastrointestinale Hormone (Gastrin-17, Somatostatin, Glucagon-like Peptide-1, Insulin und Neuromedin C) auf die vagal prästimulierte Ghrelinsekretion?

2. Material und Methoden

2.1. Übersicht

Die Versuche wurden am isolierten Rattenmagen durchgeführt. Ziel der Präparation nach einer von Schusdziarra und Mitarbeitern 1983 (190) bereits beschriebenen Technik war die Perfusion des Magens *in vitro* über einen Katheter im Truncus coeliacus und die Sammlung des Perfusats über eine Kanüle in der Pfortader zur Bestimmung endokriner Parameter mittels Radioimmunoassay. Durch luminale Perfusion des Magens konnte der intragastrale pH-Wert eingestellt werden.

2.2. Versuchstiere

Die Versuche wurden mit 200 – 400 g schweren männlichen Wistar-Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) durchgeführt, die im Veterinärbereich des Instituts für experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München gemäß den Tierschutzbestimmungen unter standardisierten Bedingungen gehalten wurden. Bei einem künstlichen Tag-/Nacht-Rhythmus, einer Raumtemperatur von 20-23 C und einer Luftfeuchtigkeit von 60-70% erhielten sie Alleinfuttermittel für Ratten (Altromin GmbH, Lage) sowie Wasser *ad libitum*.

Den Versuchstieren wurde mindestens 12 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen, sie hatten jedoch weiterhin freien Zugang zu Wasser. Die Zuordnung zu Versuchs- und Kontrollgruppe erfolgte randomisiert.

2.3. Präparation

Nach einer Kurznarkose mit Kohlendioxid wurden die Versuchstiere durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital-Natrium (Narcofen, Rhone-Merieux GmbH, Laupheim) in einer Dosierung von 50 mg/kg KG narkotisiert. Nach Eintreten einer adäquaten Narkosetiefe wurden sie gewogen und in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert.

Die Präparation begann mit der Eröffnung des Abdomens durch einen etwa 5 cm langen Längsschnitt in der Medianen entlang der Linea alba. Nach doppelter Ligatur der Vasa epigastrica auf jeder Seite wurde die seitliche Bauchwand jeweils dazwischen ca. 1,5 cm tief eingeschnitten, so dass ein genügend großes Präparationsfeld entstand.

Auf die Darstellung des Magens und dessen Mobilisierung durch Durchtrennung der Magenligamenta folgte die Entfernung von Milz und Omentum minus nach Ligatur der sie versorgenden Gefäße unter Schonung der Vasa gastro-omentalia an der großen Kurvatur. Das Pankreas, das größtenteils im Mesenterium des Duodenum liegt, wurde durch Ligatur der Gefäße vom Duodenum abgesetzt. Nun konnte das Duodenum ca. zwei Zentimeter distal des Pylorus doppelt ligiert und dazwischen durchtrennt werden.

Der Magen wurde nun nach rechts verlagert, um die Aorta abdominalis vom Truncus coeliacus bis zum Abgang der Arteria renalis sinistra freizupräparieren. Drei Schlingen, eine proximal des Truncus coeliacus und zwei zwischen Truncus coeliacus und Arteria mesenterica superior, wurden gelegt, jedoch noch nicht zugezogen. Die Aorta wurde nach distal hin durch eine Ligatur unmittelbar proximal des Abgangs der Arteria renalis sinistra komplett verschlossen; ebenso wurden die Arteria mesenterica superior und - sofern als anatomische Variation hier vorhanden - auch die Arteria renalis dextra, sowie dorsale Abgänge der Aorta abgebunden. Nach Anlegen einer Arterienklemme unmittelbar kranial des Truncus coeliacus, erfolgte die Einführung eines Katheters (Silastic-Katheter, Portex Inc., Hythe, England, 0,75 mm) durch eine Inzision zwischen Aorta und Arteria mesenterica superior. Der Katheter wurde bis zum Truncus coeliacus vorgeschoben und mit den beiden unteren der zuvor geschlungenen Fäden doppelt fixiert. Danach wurde die Arterienklemme wieder geöffnet, um die Durchblutung des

Magens für die verbleibende Präparationszeit zu ermöglichen. Die Ischämiezeit des Magens während der Aortenkanülierung betrug etwa eine Minute. Im Fortgang der Präparation wurde der Katheter etwa alle zwei Minuten mit etwa 0,2 ml heparinierter isotonischer Kochsalzlösung (25.000 I.E. Liquemin auf 1000 ml 0,9%ige Kochsalzlösung) angespült, um eine Thrombosierung zu vermeiden.

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

Nachdem der Oesophagus in seinem subdiaphragmalen Teil möglichst weit oral durchtrennt worden ist, wurde schließlich die verbleibende offene Schlinge um die Aorta, die ja proximal des Truncus coeliacus lag, zugezogen, wodurch die Durchblutung des Magens endgültig unterbrochen wurde. Nach der Ligatur der Vena portae im Ligamentum hepatoduodenale wurde der Magen gründlich mit etwa 10ml heparinierter isotoner Kochsalzlösung gespült, um Blutreste zu entfernen und somit einer Thrombosierung entgegenzuwirken. Schließlich wurde der Magen unter Erhaltung der Gefäßversorgung aus dem Situs geschnitten. Am Präparat wurden nun je ein Katheter in den Oesophagus (abgeschnittene Perfusor -Leitung, Typ N, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) und durch das Duodenum in den Magen (Modifizierter Frauenkatheter, CH14, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) eingeführt und fixiert, um den Magen auch luminal perfundieren und somit den intragastralen pH-Wert konstant halten zu können. Zur Entfernung möglicher Nahrungsreste wurde der Magen über den Oesophaguskatheter mit etwa 20 ml isotoner Kochsalzlösung durchgespült. Das Präparat wurde nun in einem auf 37 C angewärmten, mit Krebs-Ringer-Puffer gefüllten Organbad aufgehängt und an das Perfusionssystem angeschlossen. Schließlich wurden die Nervi vagi seitlich des Oesophagus durch zwei bipolare Platinstimulationselektroden

aufgegriffen und unter leichtem Zug gespannt. Über einen elektrischen Impulsgeber konnte so je nach Versuchsprotokoll eine elektrische Stimulation der Nerven erfolgen. Bei einer Gesamtdauer der Präparation von etwa 40-45 Minuten betrug die Ischämiezeit zwischen Ligatur der Aorta abdominalis und der maschinellen Perfusion mit oxigeniertem Puffer etwa sechs Minuten.

2.4. Perfusion

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

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

Um den intragastralen pH-Wert konstant zu halten wurde der Magen luminal mit isotoner Natriumchloridlösung perfundiert, die je nach Versuchsaufbau mit 1 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,0 oder 2,0 eingestellt wurde. Das luminale Perfusat wurde verworfen.

Substanz	Hersteller
Actrapid	Novo Nordisk Pharma GmbH, Kopenhagen, Dänemark
Atropin	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbogen	Linde AG, Wiesbaden
Gastrin-17	BACHEM Biochemica GmbH, Heidelberg
Glucagon-like Peptide-1(7-36)amid	BACHEM Biochemica GmbH, Heidelberg
Glucose 5%ige Lösung	Deltaselect GmbH, Pfulingen
Humanalbumin 20%	Pharmacia & Upjohn GmbH
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat, primäres	Merck, Darmstadt
Liquemin 2500IE/5ml	Roche AG, Grenzach-Wyhlen
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid 0,9%ige Lösung	Deltaselect GmbH, Pfulingen
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München
Neuromedin C	BACHEM Biochemica GmbH, Heidelberg
Salzsäure 1M	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München
Somatostatin	BACHEM Biochemica GmbH, Heidelberg

Tabelle 1: Herkunftsverzeichnis der verwendeten Substanzen.

2.5. Versuchsprotokolle

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

durchgeführt. Die Frequenz wurde in Abhängigkeit zum Versuchsaufbau variiert. Der intragastrale pH wurde auf 2,0 eingestellt, lediglich bei der einfachen elektrischen Stimulationsversuchen wurden einige Versuche bei einem pH von 7,0 durchgeführt.

2.5.1. Vagusstimulation

Der Nervus vagus wurde sowohl in den vorwiegend cholinerg wirksamen Frequenzen 2Hz und 5Hz stimuliert, als auch mit 10Hz und 20Hz, um die überwiegend peptiderge Transmission anzusprechen. Die Versuche wurden bei einem intragastralen pH-Wert von 7,0 und 2,0 durchgeführt. Pro Magen wurde mit je zwei Frequenzen bei gleichbleibendem pH-Wert stimuliert, und zwar entweder mit 2Hz und 10Hz oder mit 5Hz und 20Hz, dabei jeweils zuerst mit der niedrigeren Frequenz. Die jeweils zehnminütigen Stimulationsphasen lagen 15 Minuten auseinander. Außerdem wurde die Sekretionsleistung zehn Minuten vor der ersten Stimulation sowie zehn Minuten nach der letzten Stimulation erfasst.

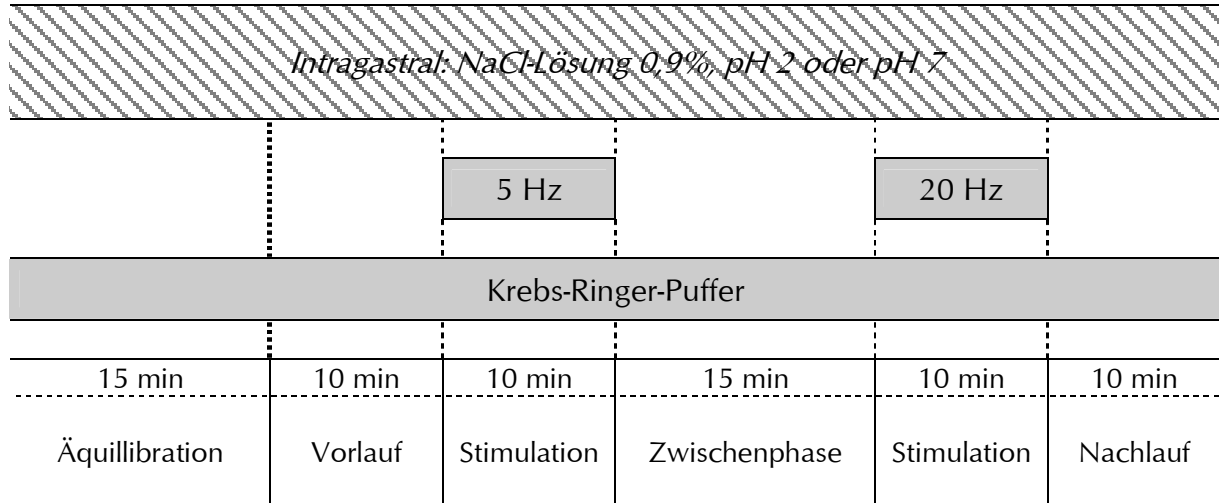


Abbildung 1: Versuchsschema zur elektrischen Vagusstimulation mit 5 Hz und 20 Hz für jeweils zehn Minuten. Während des gesamten Versuches wurde vaskulär mit Krebs-Ringer-Puffer und luminal mit einer auf pH2 oder pH7 titrierten isotonen Natriumchloridlösung perfundiert. Zwischen den Stimulationsphasen lag ein stimulationsfreies Intervall von 15 Minuten, vor der ersten Stimulation wurde ebenfalls für 25 Minuten nicht stimuliert, davon wurden zehn Minuten als „Vorlauf“ im Fraktionssammler aufgefangen. Nach der zweiten Stimulationsphase wurde für weitere zehn Minuten das Perfusat als „Nachlauf“ gesammelt.

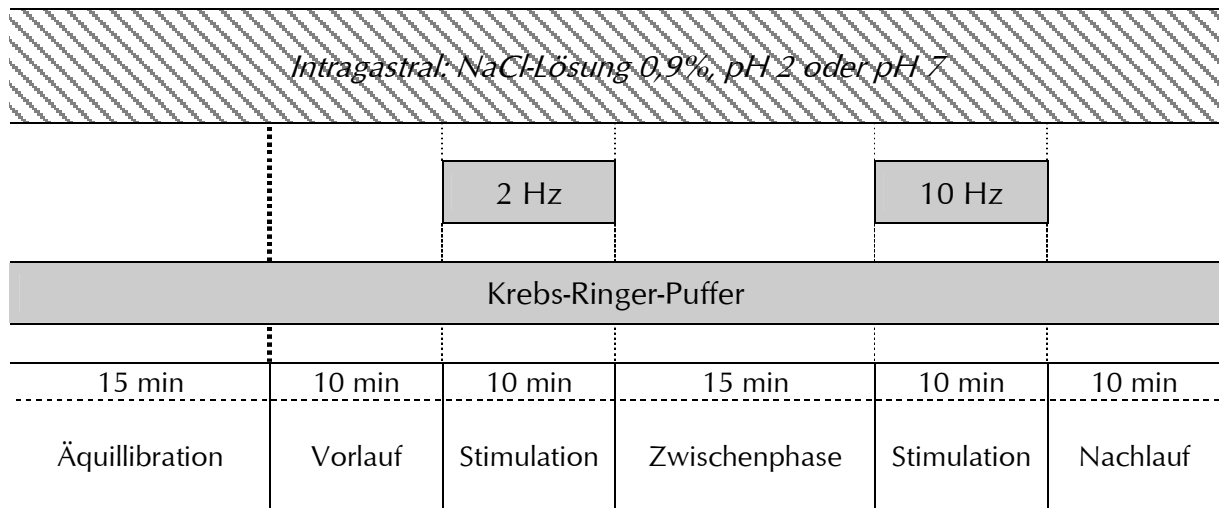


Abbildung 2: Versuchsschema zur elektrischen Vagusstimulation mit 2 Hz und 10 Hz für jeweils zehn Minuten. Während des gesamten Versuches wurde vaskulär mit Krebs-Ringer-Puffer und luminal mit einer auf pH2 oder pH7 titrierten isotonen Natriumchloridlösung perfundiert. Zwischen den Stimulationsphasen lag ein stimulationsfreies Intervall von 15 Minuten, vor der ersten Stimulation wurde ebenfalls für 25 Minuten nicht stimuliert, davon wurden zehn Minuten als „Vorlauf“ im Fraktionsammler aufgefangen. Nach der zweiten Stimulationsphase wurde für weitere zehn Minuten das Perfusat als „Nachlauf“ gesammelt.

2.5.1.1. Vagusstimulation über 40 Minuten

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

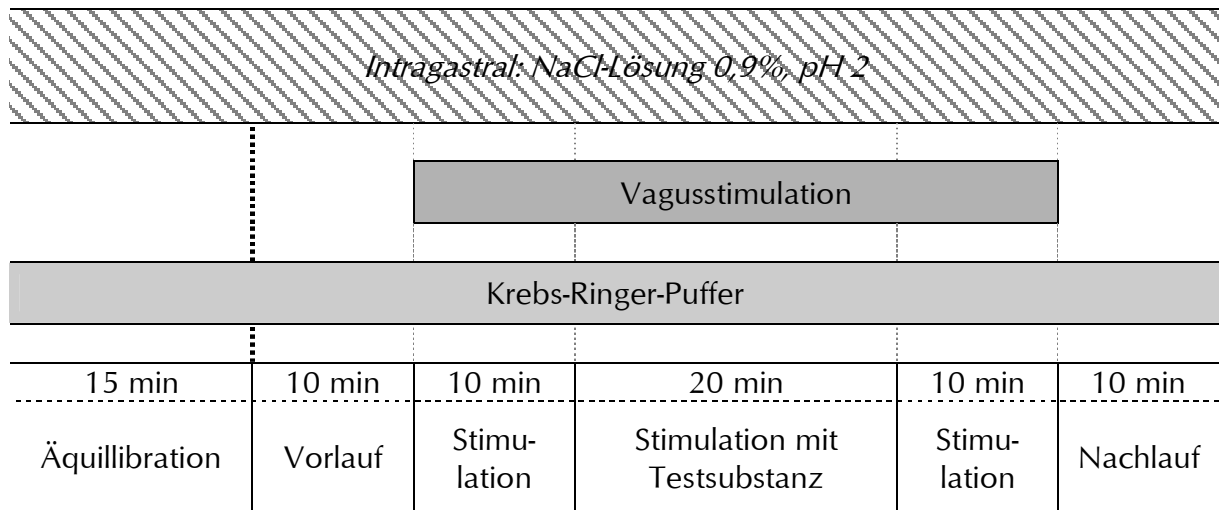


Abbildung 3: Versuchsschema zur Vagusstimulation bei 2Hz und 10Hz über einen Zeitraum von 40 Minuten. Während des gesamten Versuches wurde vaskulär mit Krebs-Ringer-Puffer und luminal mit einer auf pH2 titrierten isotonen Natriumchloridlösung perfundiert. Dem Beginn der Elektrostimulation ging eine stimulationsfreie Phase von 25 Minuten voran, von der das Perfusat der letzten 10 Minuten als „Vorlauf“ gesammelt wurden. Ebenso wurden nach dem Ausschalten für weitere 10 Minuten Proben gesammelt (Nachlauf).

2.5.1.2. Vagusstimulation unter Atropin

Um die Wertigkeit des cholinergen Systems bei der vagal induzierten Stimulation der Ghrelinfreisetzung zu evaluieren, wurde in Anlehnung an das Versuchsprotokoll für gastrointestinale Hormone (siehe 2.5.2) Atropin für 20 Minuten in einer Konzentration von 10^{-6} M innerhalb einer Gesamtstimulationszeit von 40 Minuten perfundiert. Da das cholinerge System in Abhängigkeit von der verwendeten Stimulationsfrequenz in unterschiedlichem Maße angesprochen wird, wurden die Versuche bei 2Hz und 10Hz durchgeführt. Zuvor wurde sichergestellt, dass die Ghrelinsekretion über einen Zeitraum von 40 Minuten durch Elektrostimulation auf konstant erhöhtem Niveau gehalten werden kann (siehe 3.1.1).

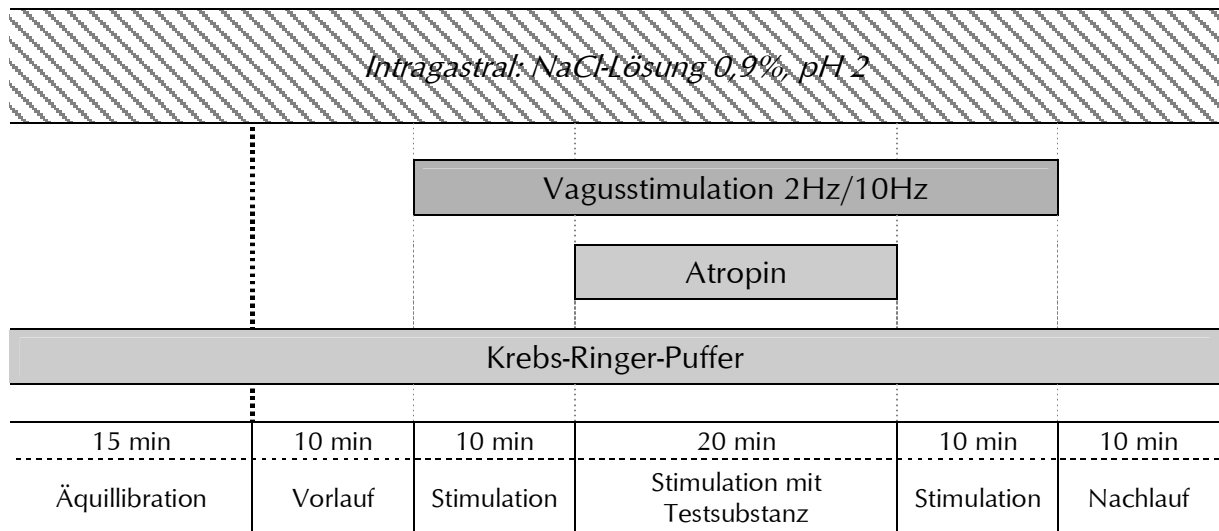


Abbildung 4: Versuchsschema zur Vagusstimulation bei 2Hz und 10Hz unter gleichzeitigem Einfluss von Atropin in einer Konzentration von 10^{-6} M. Während des gesamten Versuches wurde vaskulär mit Krebs-Ringer-Puffer und luminal mit einer auf pH 2 titrierten isotonen Natriumchloridlösung perfundiert. Atropin wurde in einer Konzentration von 10^{-6} M in Krebs-Ringer-Puffer gelöst und über 20 Minuten der insgesamt 40minütigen Elektrostimulation perfundiert. Dem Beginn der Elektrostimulation ging eine stimulationsfreie Phase von 25 Minuten voran, von der das Perfusat der letzten 10 Minuten als „Vorlauf“ gesammelt wurden. Ebenso wurden nach dem Ausschalten für weitere 10 Minuten Proben gesammelt (Nachlauf).

2.5.2. Gastrointestinale Hormone

2.5.2.1. Inhibitionsversuche

Ein weiteres Versuchsschema wurde zur Aufdeckung inhibitorisch-regulativer Einflüsse von Gastrin, Somatostatin, Insulin, GLP-1 und Cholezystokinin auf die Ghrelinsekretion im Magen angewandt. Da bei niedriger Ghrelinsekretionsrate unter unstimulierten Bedingungen physiologisch relevante Inhibitionseffekte verdeckt sein könnten, wurden die Hormone unter einer elektrischen Vorstimulation mit 10 Hz appliziert. Dabei wurde, wie in

Abbildung 5 dargestellt, das Hormon 20 Minuten innerhalb einer insgesamt 40minütigen Stimulationsphase infundiert, der eine Basalperiode von jeweils 10 Minuten voran ging und folgte. Zuvor wurde sichergestellt, dass die Ghrelinsekretion über einen Zeitraum von 40 Minuten durch Elektrostimulation auf konstant erhöhtem Niveau gehalten werden kann.

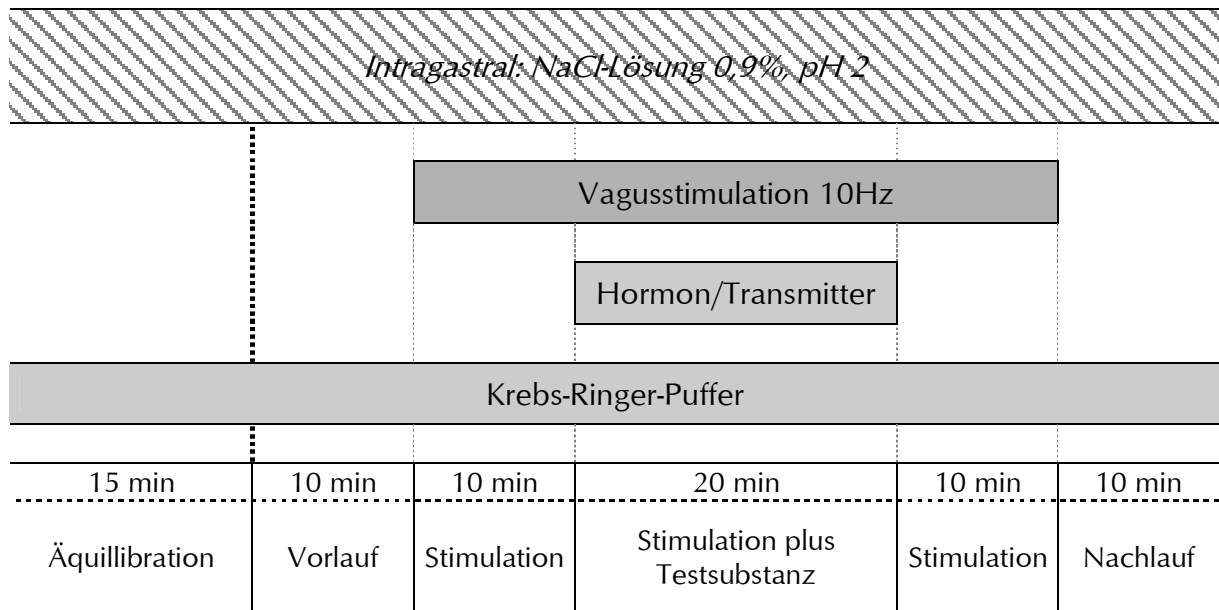


Abbildung 5: Versuchsschema zur Austestung verschiedener gastrointestinaler Hormone unter elektrischer Prästimulation des N. vagus bei 10 Hz. Während des gesamten Versuches wurde vaskulär mit Krebs-Ringer-Puffer und luminal mit einer auf pH 2 titrierten isotonen Natriumchloridlösung perfundiert. Die zu untersuchende Substanz wurde in der entsprechenden Konzentration in Krebs-Ringer-Puffer gelöst und über 20 Minuten der insgesamt 40minütigen Elektrostimulation perfundiert. Dem Beginn der Elektrostimulation ging eine stimulationsfreie Phase von 25 Minuten voran, von der das Perfusat der letzten 10 Minuten als „Vorlauf“ gesammelt wurden. Ebenso wurden nach dem Ausschalten für weitere 10 Minuten Proben gesammelt (Nachlauf).

2.5.2.2. Stimulationsversuche

Analog zum Versuchsaufbau der unter 2.6.1. beschriebenen elektrischen Vagusstimulation wurde versucht, eine Stimulation der Ghrelinsekretion durch Infusion mit Neuromedin C zu zeigen. Hierbei wurde die Substanz zunächst in der niedrigeren Konzentration von 10^{-8} M, dann in der höheren Konzentration von 10^{-6} M appliziert (siehe Abb.2.3). Da diesen Versuchen die Intention zugrunde lag, die Ghrelinsekretion zu stimulieren, wurde im Gegensatz zu den Suppressionsversuchen mit den anderen genannten Hormonen auf die elektrische Grundstimulation verzichtet. Neuromedin C wurde zweizeitig in ansteigenden Konzentrationen von 10^{-8} M und 10^{-6} M mit einem freien Intervall von 15 Minuten appliziert. Der ersten Stimulation ging eine fünfzehnminütige Äquilibrierungsphase und eine zehnminütige Vorlaufphase voran. Der zweiten Stimulationsphase war eine ebenfalls zehnminütige Nachlaufphase nachgestellt.

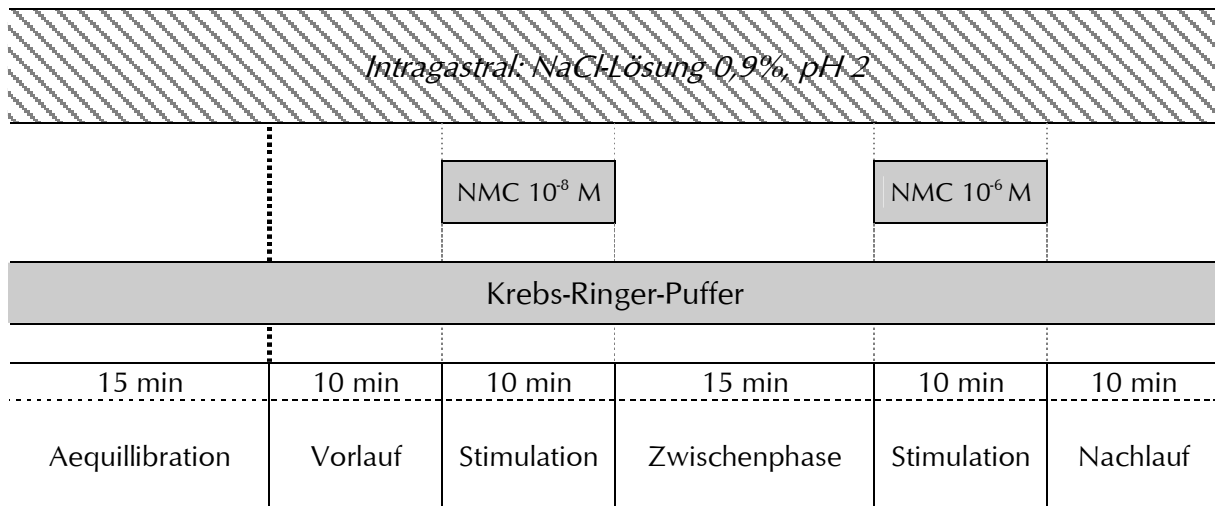


Abbildung 6: Versuchsschema zum Stimmulationsversuch mit Neuromedin C (NMC) für jeweils zehn Minuten in Konzentrationen von 10⁻⁸M und 10⁻⁶M. Während des gesamten Versuches wurde vaskulär mit Krebs-Ringer-Puffer, je nach Phase mit oder ohne gelöstes NMC, und luminal mit einer auf pH2 titrierten isotonen Natriumchloridlösung perfundiert. Zwischen den Stimmulationsphasen lag ein stimulationsfreies Intervall von 15 Minuten, vor der ersten Stimulation wurde ebenfalls für 25 Minuten nicht stimuliert, davon wurden zehn Minuten als „Vorlauf“ im Fraktionssammler aufgefangen. Nach der zweiten Stimmulationsphase wurde für weitere zehn Minuten das Perfusat als „Nachlauf“ gesammelt.

2.6. Auswertung

2.6.1. Radioimmunoassay

Die Bestimmung der Ghrelinkonzentration in den Proben erfolgte radioimmunologisch auf Grundlage der erstmals 1960 von Yalow und Berson beschriebenen Technik (250). Das Prinzip des Radioimmunoassays besteht darin, dass das in einer Probe in unbekannter Konzentration enthaltene Antigen mit einem zugesetzten radioaktiv markierten Antigen, dem sogenannten „Tracer“, um Bindungsstellen eines spezifischen Antikörpers, der im Unterschuß vorliegt, konkurriert. Da die Antigen-Antikörper-Bindung reversibel ist, stellt sie chemisch gesehen eine Gleichgewichtsreaktion dar, so dass sich nach einer Inkubationszeit das Verhältnis des gebundenen Tracers zu gebundenem unmarkiertem Antigen dem Verhältnis der Konzentrationen entspricht. Nach der Trennung von freiem und gebundenem Antigen mittels Immunpräzipitation oder Adsorption an Aktivkohle mit anschließender Zentrifugation und Dekantierung kann im Szintillations-Gamma-Zähler die Radioaktivität der Probe gemessen werden, die mit der Konzentration des zu bestimmenden Peptids korreliert. Durch Messung verschiedener bekannter

Konzentrationen des Peptids in einer Standardverdünnungsreihe, kann ein Faktor für die Umrechnung von Gamma-Zählern in Peptidkonzentration ermittelt werden.

2.6.1.1. Ghrelinbestimmung

Die Ghrelinkonzentration wurde in jeder zweiten (ungeraden) Probe bestimmt. Dazu wurde ein im Handel erhältliches Ghrelin Radioimmunoassay Kit (Phoenix Pharmaceuticals, USA) verwendet. Entsprechend den Anweisungen des Herstellers wurde den mit Ghrelinantikörpern vom Kaninchen über 24 Stunden inkubierten Proben nach mit ^{125}I markiertes Rattenghrelin als Tracer zugesetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde der zweite Antikörper und Schafserum zugesetzt, um die Antikörper auszufällen. Nach Zentrifugierung und Absaugen erfolgte die automatisierte Messung im Gamma-Zähler. Die Sensitivität des Assays lag bei 1-128 pg/ml. Der Variationskoeffizient zwischen den Assays betrug 10%, innerhalb der Assays 4%. Eine Kreuzreaktivität der infundierten Substanzen mit dem Antikörper wurde durch regelmäßige Mitbestimmung in verschiedenen Konzentrationen ausgeschlossen.

2.6.2. Statistik

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

3. Ergebnisse

3.1. Vagusstimulation

Bei einem intraluminalen pH-Wert von 2 zeigte die elektrische Stimulation des Nervus Vagus durch eine Rechteckspannung von 10 Volt und 1 ms Impulsdauer bei allen untersuchten Frequenzen eine signifikante Stimulation der Ghrelinsekretion. Im Einzelnen wurde für 2Hz, 5Hz, 10Hz und 20Hz jeweils eine Erhöhung der Ghrelinausschüttung von 1880 ± 580 pg / 10 min (n=8), 5400 ± 65 pg / min (n=7), 3060 ± 650 pg / 10 min (n=8) und 5070 ± 420 pg / 10 min (n=7) gemessen, wobei für alle Ergebnisse $p < 0,05$ gilt. Die Steigerung der Werte in der 2Hz und 10Hz Gruppe waren geringer als in den anderen Gruppen, was auf ein geringeres Basalsekretionsniveau zurückzuführen ist. Die relative Stimulation betrug jedoch 130% für 2Hz, 133% für 5Hz, 177% für 10Hz und 146% für 20Hz und wies somit keinen signifikanten Unterschied auf.

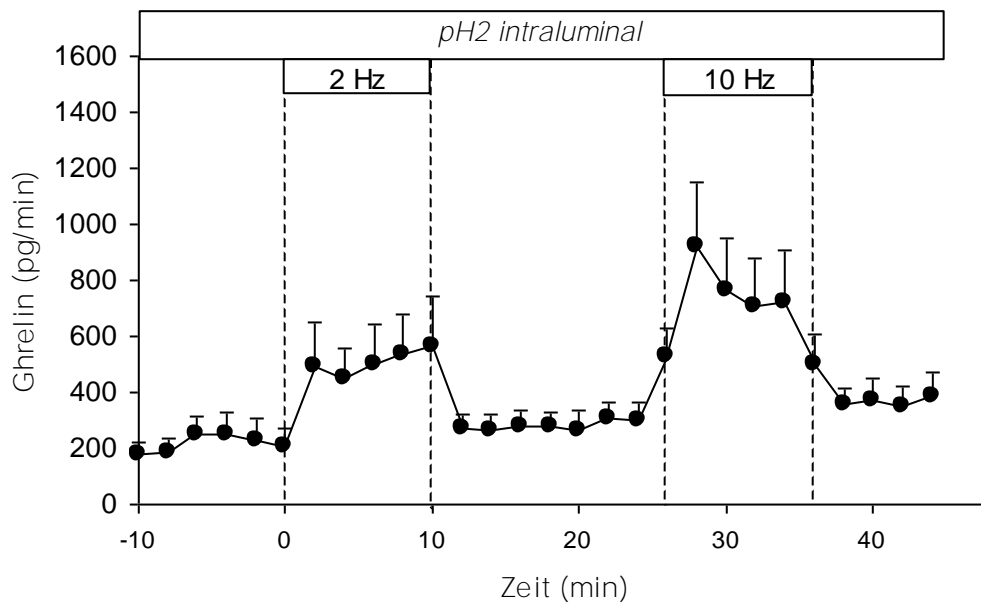


Abbildung 7: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse der Vagusstimulation mit einer Frequenz von 2 Hz und 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=8).

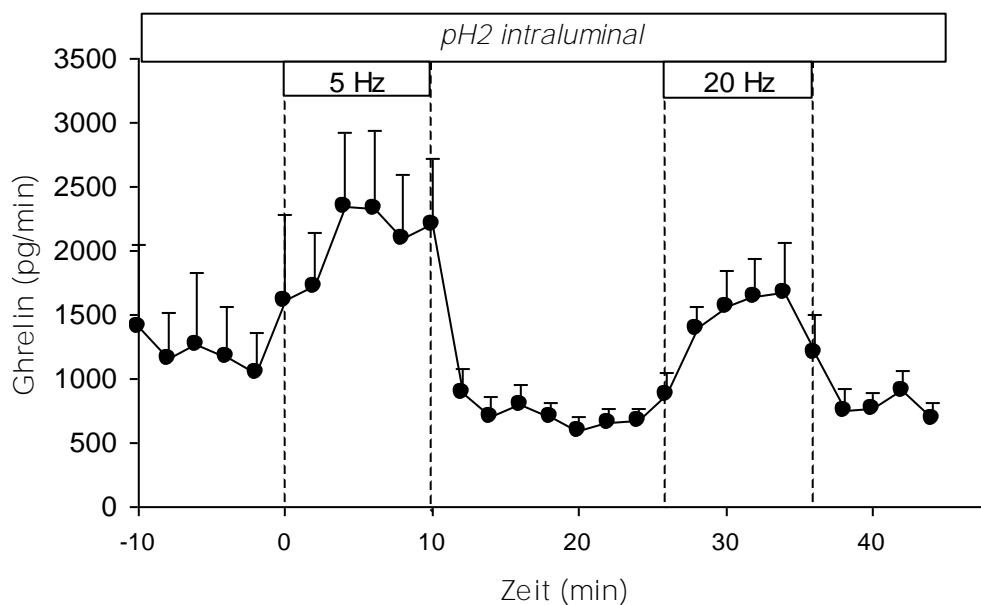


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse der Vagusstimulation mit einer Frequenz von 5 Hz und 20 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=7).

Die unter gleichen Bedingungen bei neutralem intragastralem pH durchgeführten Versuche zeigten eine Stimulation der Ghrelinsekretion von 7010 ± 510 pg / 10 min bei

2 Hz (n=7), 5910 1070 pg / 10 min bei 5 Hz (n=8), 5189 1200 pg / 10 min bei 10 Hz (n=7) und 4060 690 pg / 10 min bei 20 Hz (n=8); dabei lag p jeweils <0,05.

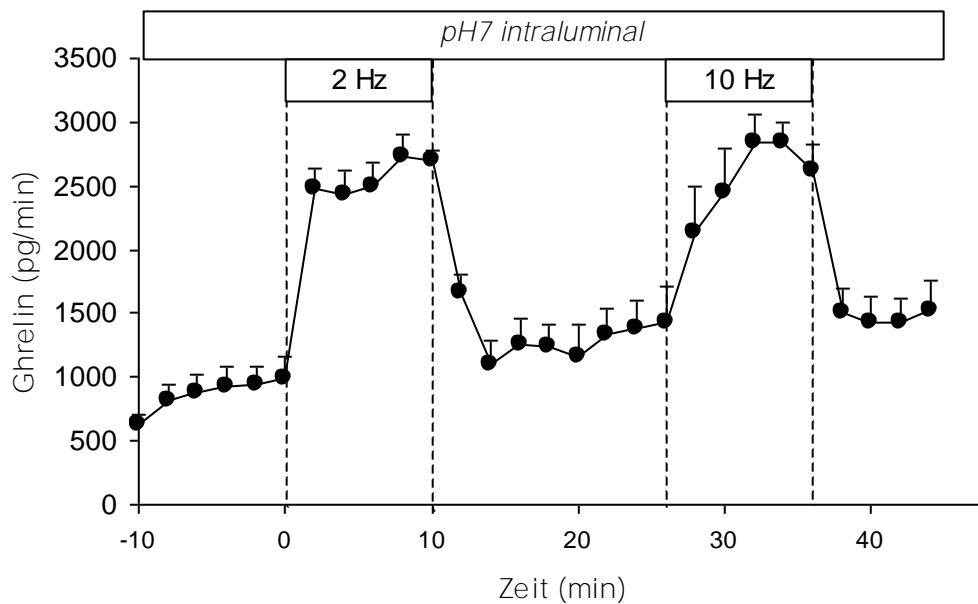


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse der Vagusstimulation mit einer Frequenz von 2 Hz und 10 Hz bei neutralen intragastralen pH-Wert. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=7).

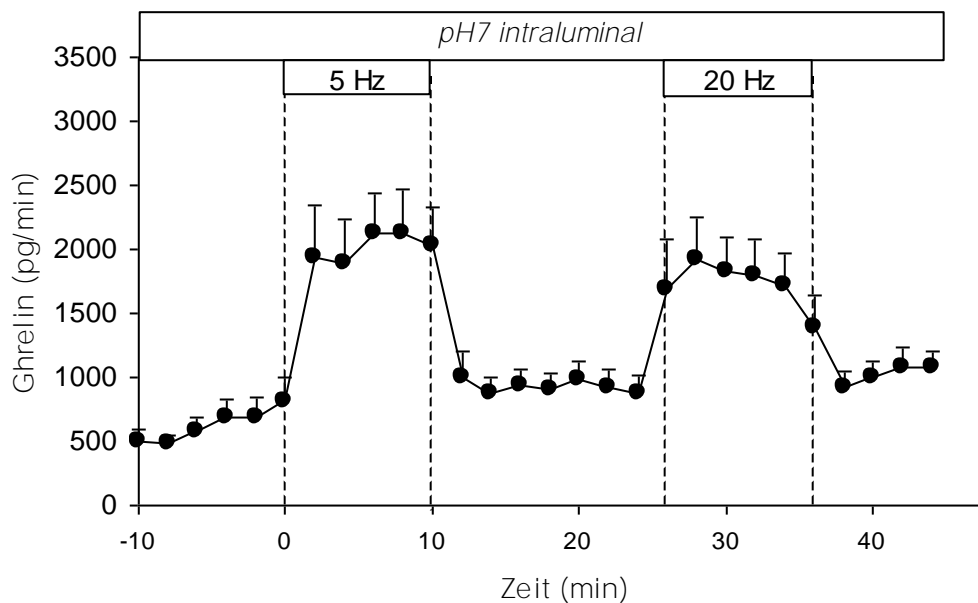


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse der Vagusstimulation mit einer Frequenz von 2 Hz und 10 Hz bei neutralen intragastralen pH-Wert. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=7).

3.1.1. Vagusstimulation über 40 Minuten

Für die Versuche mit gastrointestinalen Hormonen, wie auch die mit Atropin musste gemäß Versuchsprotokoll zunächst sichergestellt werden, dass durch die elektrische Vagusstimulation die Ghrelinsekretion auch über einen Zeitraum von 40 Minuten auf konstant erhöhtem Niveau gehalten werden kann.

Die Experimente fanden unter elektrischer Vorstimulation mit 10Hz bei einem intraluminalen pH-Wert von 2, der dem physiologischerweise in der postprandialen und interdigestiven Phase vorherrschenden pH entspricht, statt. Daneben wurde für die Versuche mit Atropin neben der Frequenz von 10Hz auch mit 2Hz stimuliert. Auch während dieser längeren Stimulationszeit von 40 Minuten blieb die Sekretion konstant bei beiden Stimulationsfrequenzen erhöht und fiel nach Ende der Stimulationsperiode wieder auf Ausgangsniveau zurück, wenn auch bei Stimulation mit 2Hz in geringerem Maße.

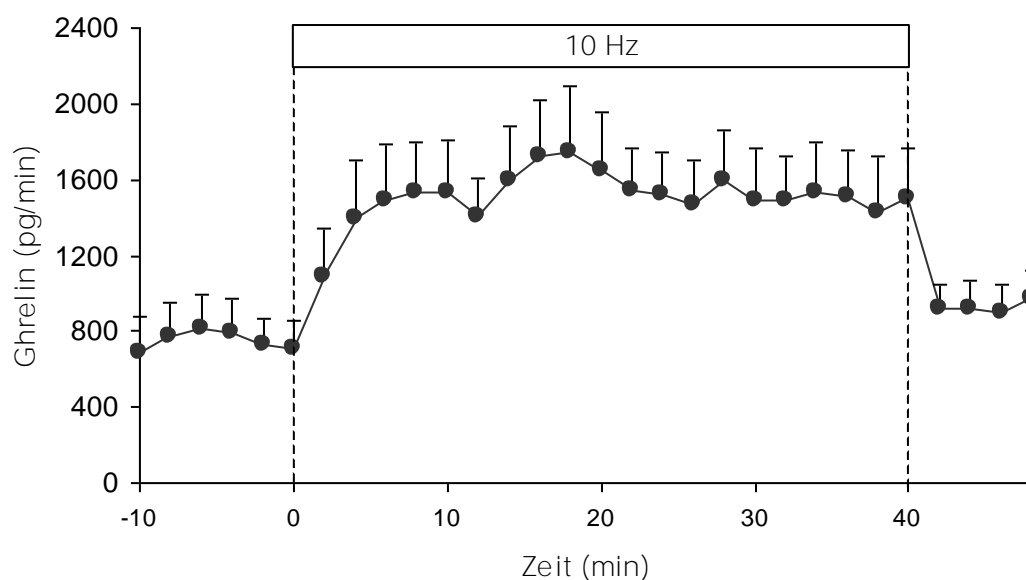


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse der Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=8).

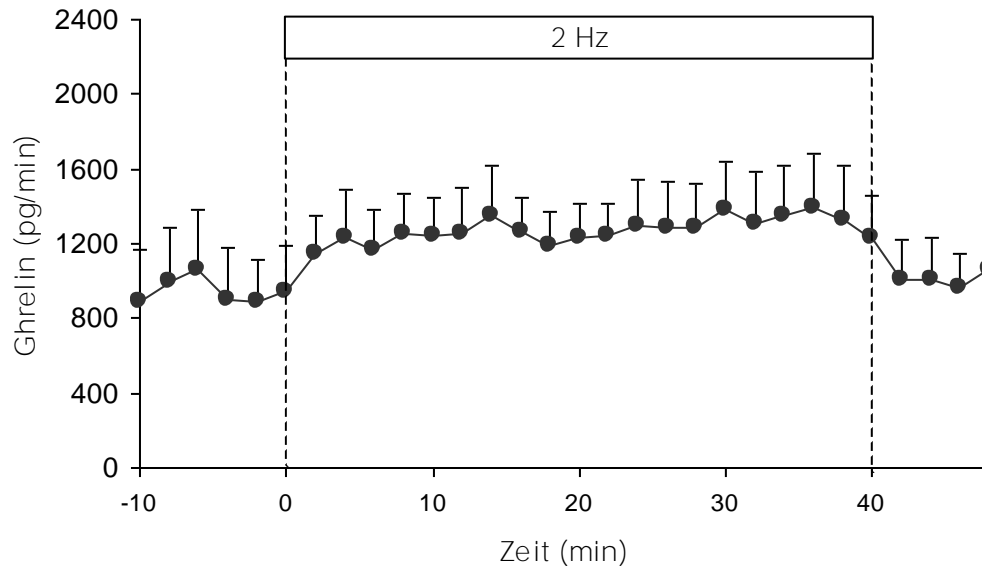


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse der Vagusstimulation mit einer Frequenz von 2Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=8).

3.1.2. Vagusstimulation unter Einfluss von Atropin

Die Wirkung von Atropin in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l auf die Ghrelinsekretion bei elektrischer Stimulation des N. vagus wurde bei Frequenzen von 2Hz und 10Hz untersucht. Dabei zeigte sich eine Verminderung der Ghrelinsekretion von -2741 ± 1178 pg / 20 min (n=8, $p>0,05$) in der Gruppe, die mit 2 Hz stimuliert wurden und eine verringerte Freisetzung von -1227 ± 729 pg / 20 min (n=8, $p>0,05$) bei 10Hz.

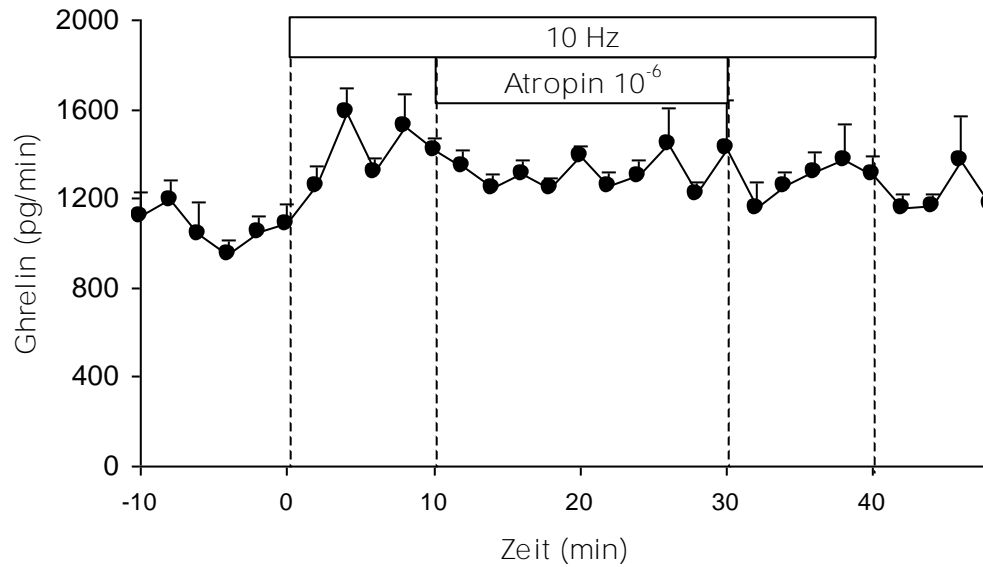


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse bei Infusion von Atropin in einer Konzentration von 10^{-6} M während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=8).

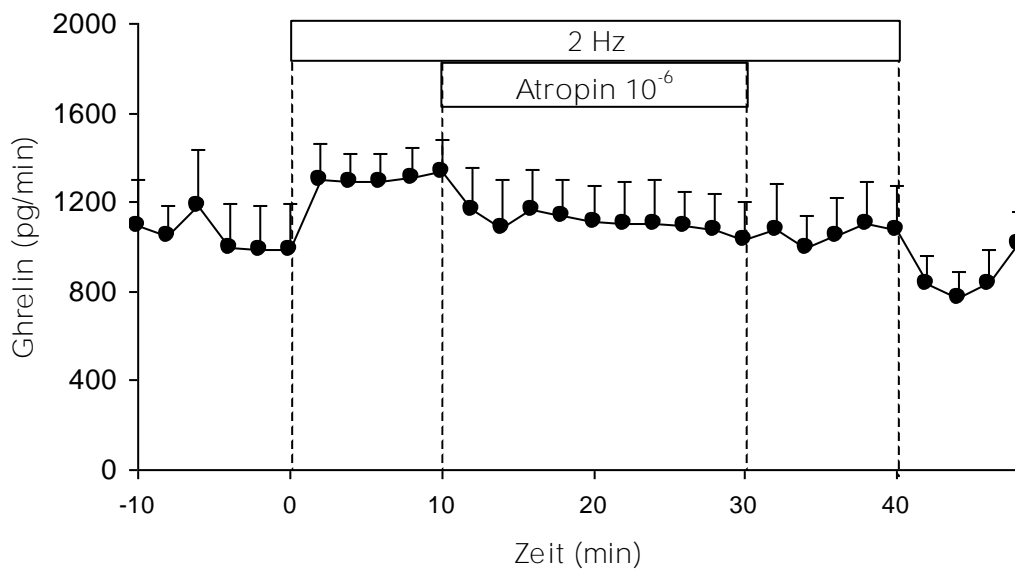


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse bei Infusion von Atropin in einer Konzentration von 10^{-6} M während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 2Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=8).

3.2. Gastrointestinale Hormone

3.2.1. Gastrin-17

Die Infusion von Gastrin-17 unter vagaler Vorstimulation zeigte bei einer Konzentration 10^{-8} M eine signifikante Verringerung der Ghrelinausschüttung von 1593 ± 1407 pg / 20 min ($n=7, p<0,05$), wohingegen bei weiterer Verdünnung auf 10^{-10} M kein Effekt mehr erkennbar war (1140 ± 774 pg / 20 min ($n=8, p>0,05$)).

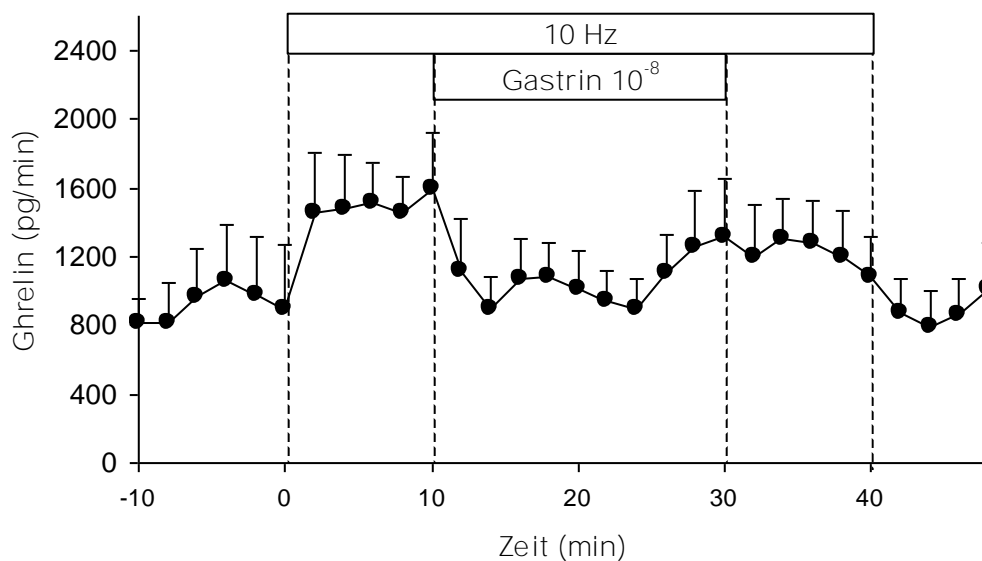


Abbildung 15: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse bei Infusion von Gastrin in einer Konzentration von 10^{-8} M während einer Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen ($n=7$).

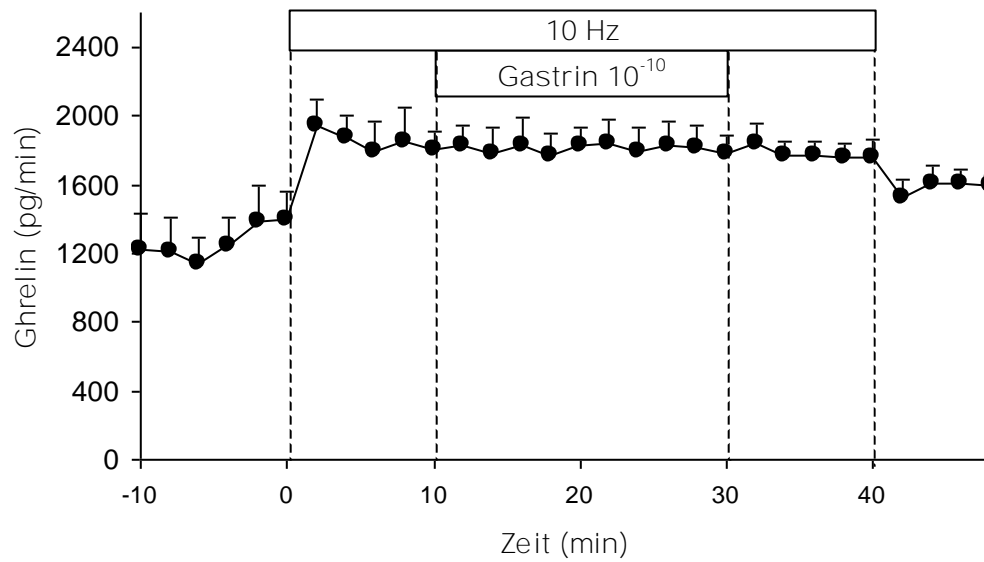


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse bei Infusion von Gastrin in einer Konzentration von 10^{-10} M während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=6).

3.2.2. Somatostatin

Die Infusion von Somatostatin in einer Konzentration von 10^{-6} M verringerte bei vagaler Vorstimulation die Ghrelinsekretion um -5570 ± 1097 pg / 20 min ($n=8, p<0,05$).

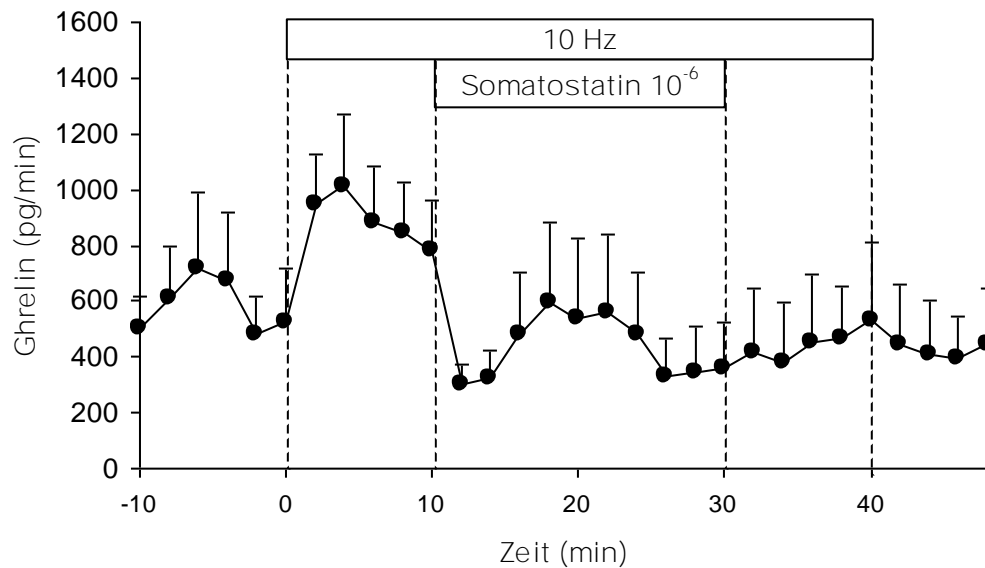


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse bei Infusion von Somatostatin in einer Konzentration von 10^{-6} M während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen ($n=7$).

3.2.3. Glucagon-like-Peptide-1(7-36)

Unter den unter 2.5.2 beschriebenen Versuchsbedingungen wies GLP-1(7-36) in den Konzentrationen 10^{-10} M und 10^{-9} M einen geringen, jedoch nicht signifikanten inhibitorischen Effekt von jeweils -2650 ± 1240 pg / 20 min (n=6) und -2410 ± 410 pg / 20 min (n=7). Hingegen war der inhibitorische Effekt in den höheren Konzentrationen von 10^{-8} M und 10^{-7} M signifikant; die gemessenen Werte betragen jeweils -8250 ± 1800 pg / 20 min (n=6, p<0,05) und -4390 ± 770 pg / 20 min (n=5, p<0,05).

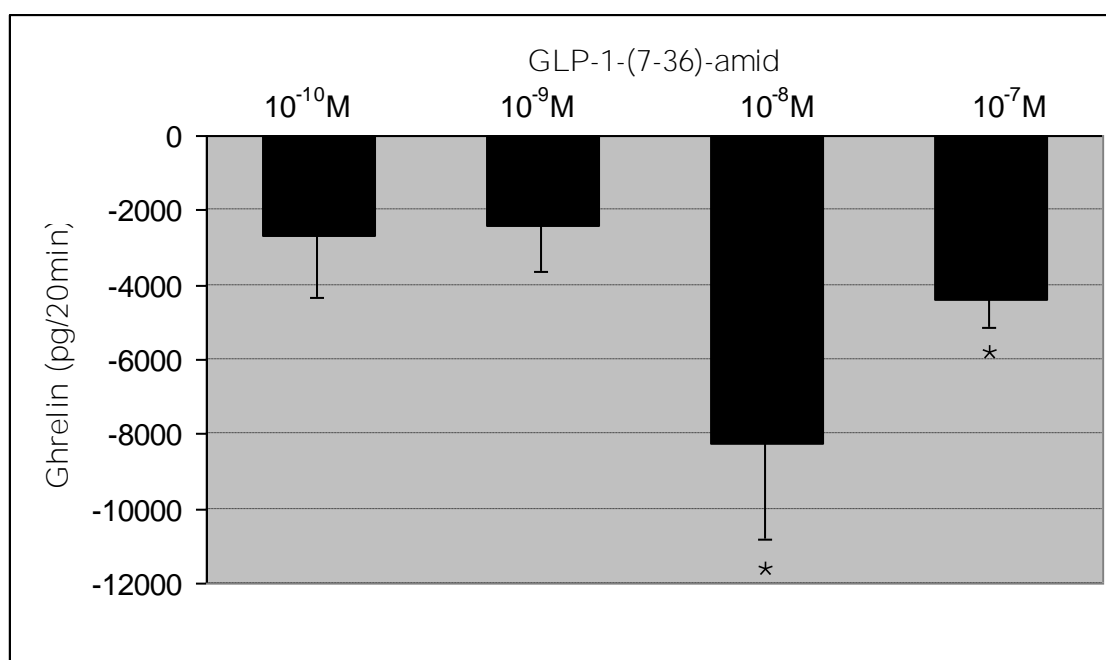


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Veränderung der Ghrelinsekretion bei Infusion von Glucagon-like-peptide-1(7-36)amid in einer Konzentration von 10^{-10} M (n=6), 10^{-9} M (n=7), 10^{-8} M (n=6) und 10^{-7} M (n=5) während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen. Signifikante Werte sind mit * gekennzeichnet.

3.2.4. Insulin

Bei der Infusion von Insulin zeigte sich wie in Abbildung 19 dargestellt ebenfalls eine Reduktion der vagal vorstimulierten Ghrelinsekretion. Diese betrug für eine Konzentration von 10^{-10} mol/l -4104 ± 1192 pg / 20 min ($n=6$, $p<0,05$), -5673 ± 1410 pg / 20 min ($n=5$, $p<0,05$) bei einer Insulinkonzentration von 10^{-8} M und blieb auch bei 10^{-6} mit einer Verminderung der Ghrelinsekretion von -5805 ± 1382 pg / 20 min ($n=5$, $p<0,05$) etwa gleich. In der Gruppe, die mit der geringsten Konzentration von 10^{-12} mol/l perfundiert wurden, zeigte sich kein signifikanter Rückgang der Ghrelinsekretion.

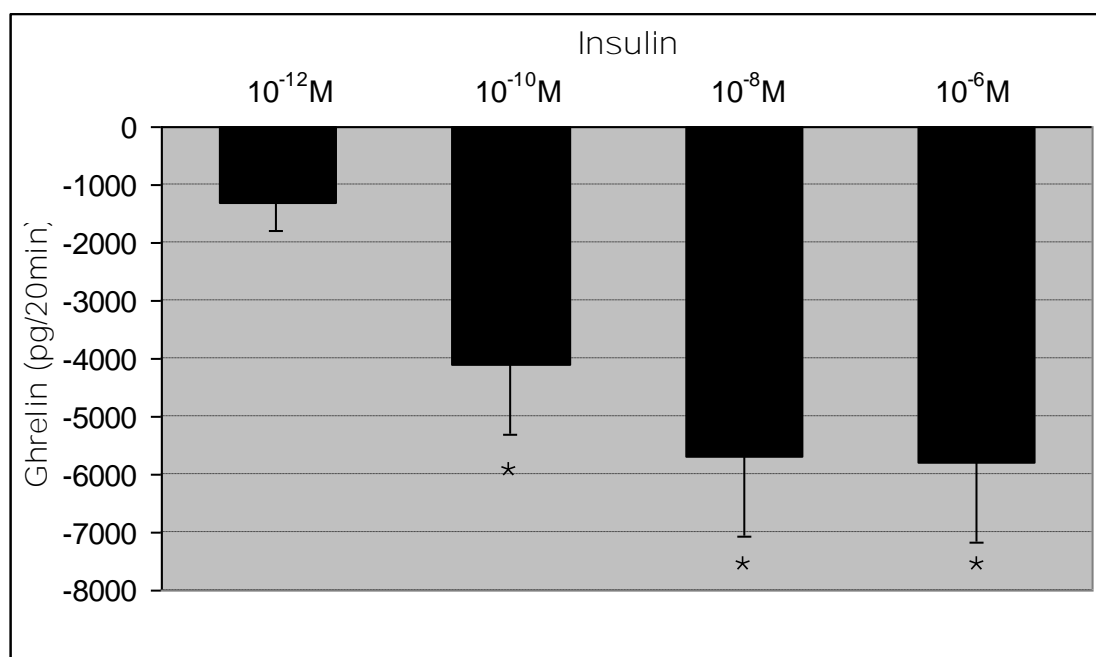


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Veränderung der Ghrelinsekretion bei Infusion von Atropin in einer Konzentration von 10^{-12} M ($n=6$), 10^{-10} M ($n=6$), 10^{-8} M ($n=5$) und 10^{-6} M ($n=5$) während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen. Signifikante Werte sind mit * gekennzeichnet.

3.2.5. Neuromedin C

Die Infusion von Neuromedin C in den Konzentrationen 10^{-8} M und 10^{-6} M hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Sekretion von Ghrelin. Die Messwerte ergaben rechnerisch eine Verminderung von $-340 \text{ pg} / 10 \text{ min}$ 180 pg ($n=6, p>0,05$) und $-380 \text{ pg} / 10 \text{ min}$ 310 pg ($n=6, p>0,05$), je für die angegebenen Konzentrationen.

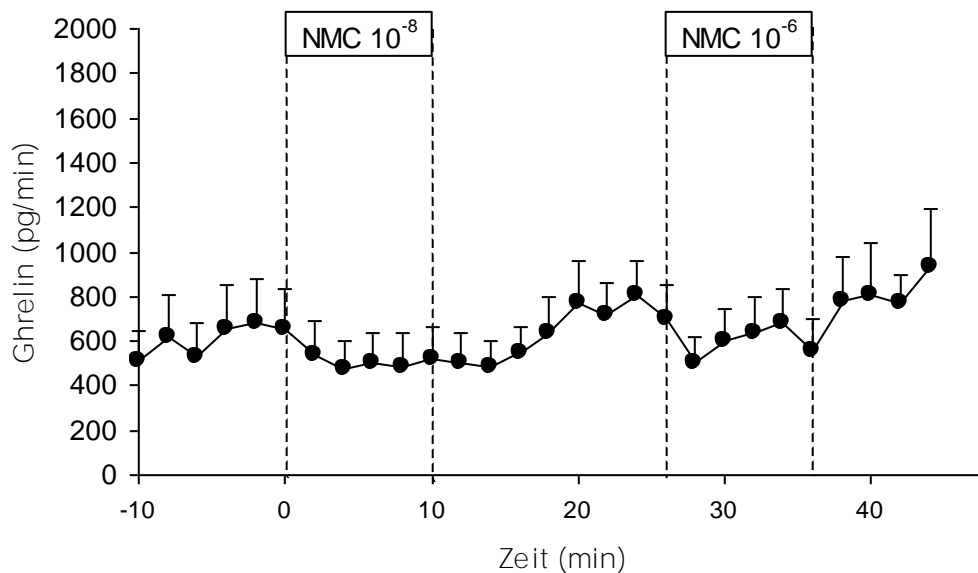


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse bei Infusion von Neuromedin C in einer Konzentration von 10^{-8} M und 10^{-6} M ohne vagale Prästimulation bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen ($n=7$).

4. Allgemeine Diskussion

4.1. Ghrelin – ein neu entdecktes Hormon

4.1.1. Isolierung und Historisches

Nach der Entdeckung von Enkephalin als dem endogenen Liganden des Morphinrezeptors 1975 wurden in der Hoffnung, weniger suchterzeugende Opioidanalgetika zu finden, viele Enkephalinderivate synthetisiert und untersucht. Dabei entdeckte 1976 die Forschungsgruppe um Cyril Bowers, dass einige Derivate des met-Enkephalins, denen die typischen Opioideigenschaften fehlten, einen – wenn auch schwachen – freisetzenden Effekt auf Somatotropin (Wachstumshormon, growth hormone, GH) hat (23,24). Dies löste eine intensive Suche nach weiteren, auch therapeutisch einsetzbaren, eventuell sogar oral wirksamen Pharmaka mit stärkerem Effekt auf die GH-Freisetzung aus. In den folgenden Jahren wurden so viele Substanzen, sowohl Peptide, wie beispielsweise Hexarelin oder auch Nicht-Peptid-Verbindungen, wie MK-0677 entwickelt, die unter dem Begriff Growth-hormone-secretagogues (GHS) zusammengefasst werden.

Nach damaliger Auffassung wurde die Sekretion des Wachstumshormons stimulierend durch GH-releasing-hormone (GHRH) und inhibierend durch Somatostatin (SRIF) reguliert, die an ihrem jeweiligen Rezeptor auf die somatotropen Zellen im Hypophysenvorderlappen wirken sollten (188). Die Untersuchungen zum Wirkmechanismus der GHS deuteten jedoch überraschenderweise darauf hin, dass diese Stoffe nicht über den Rezeptor des GHRH, sondern über einen anderen, noch unbekanntem Weg wirken müssten. Schließlich gelang es der Firma Merck 1996, den GHS-Rezeptor (GHS-R) zu klonieren und dessen Struktur aufzuklären (104). Aufgrund

der Unkenntnis eines Liganden wurde der Rezeptor zunächst als verwaist bezeichnet („orphan receptor“) (207). Die Strukturähnlichkeit mit anderen Rezeptoren deutete darauf hin, es sich bei dem unbekanntem endogenen Liganden um ein Peptid handeln könnte (104). Auf Grundlage der Erkenntnis, dass der GHS-Rezeptor bei Aktivierung zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration freier Calciumionen führt, konnte ein Bioassay zum Screening nach Liganden etabliert werden. Dabei wurde eine kultivierte GHS-R exprimierende Zelllinie verschiedenen Fraktionen aus Gewebeextrakten ausgesetzt und durch Messung der intrazellulären Calciumionenkonzentration auf eine mögliche Aktivierung des Rezeptors geschlossen. Die naheliegende Vermutung, der gesuchte endogene Ligand müsse im Gehirn zu finden sein, da der GHS-Rezeptor vorwiegend in Hypophyse und Hypothalamus gefunden wurde, konnte nicht bestätigt werden. Überraschenderweise zeigte jedoch Magengewebe eine deutliche Aktivierung des GHS-Rezeptors. Durch diverse Reinigungsverfahren gelang es schließlich der von Kojima geleiteten Forschungsgruppe aus Osaka, das aktive Peptid zu isolieren und dessen Struktur aufzuklären. 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, in diesem Fall auf GH, wirken, taufte die Entdecker das neue Hormon „Ghrelin“(120).

4.1.2. Struktur und Molekularbiologie

Ghrelin ist ein aus 28 Aminosäuren bestehendes Peptid mit einer Veresterung der Hydroxylgruppe des Serins an dritter Stelle der Aminosäuresequenz mit der Carboxylgruppe der Oktansäure. Da diese vorher noch nie bei Säugetieren beobachtete posttranslationelle Modifikation für die endokrine Wirksamkeit essentiell ist (120), muss man davon ausgehen, dass das für die Acylierung zuständige, bislang unentdeckte Enzym in der Regulation der Ghrelinproduktion eine Schlüsselfunktion einnimmt (40,103).

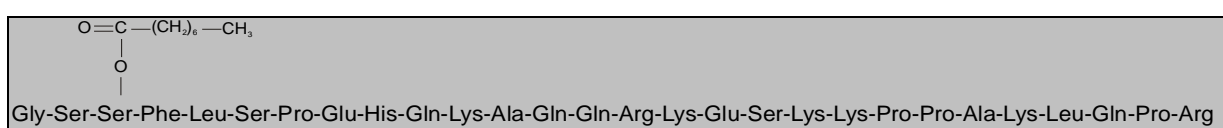


Abbildung 21: Strukturformel von Ghrelin

Das Ghrelin Gen des Menschen ist auf dem Chromosom 3 in Position p25-26 lokalisiert (156,232) und besteht aus vier Exons, die durch drei Introns voneinander getrennt werden, wobei die eigentliche Aminosäuresequenz des Peptids in Teilen der Exons 1 und 2 codiert ist (230). Primäres Translationsprodukt ist ein aus 117 Aminosäuren bestehendes Vorläufermolekül, das Präproghrelin (120). Es besteht aus einem 23 Aminosäuren langen Signalpeptid, dem die 28 Aminosäuren umfassende Ghrelinsequenz unmittelbar folgt, sowie einem Rest aus 66 Aminosäuren, der letztlich enzymatisch abgespaltet wird (122). Das Präproghrelin des Menschen und der Ratte weisen eine Deckungsgleichheit von 82,9% in der Aminosäuresequenz auf. Beim Ghrelin selbst besteht ein Unterschied in nur zwei der insgesamt 28 Aminosäuren siehe Abbildung (120).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Mensch	G	S	S*	F	L	S	P	E	H	Q	R	V	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R
Ratte	G	S	S*	F	L	S	P	E	H	Q	K	A	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R

Abbildung 22: Ghrelin-Aminosäuresequenz von Mensch (oben) und Ratte (unten). S* steht für n-oktanoyl-Serin. Schattiert dargestellt sind die nicht übereinstimmenden Aminosäuren in Position 11 und 12, die beim Menschen mit Arginin und Valin und bei der Ratte mit Lysin und Alanin besetzt sind.

4.1.3. Ghrelinderivate

Neben Ghrelin konnten sowohl in menschlichem Magengewebe, als auch im Plasma weitere Ghrelinderivate nachgewiesen werden. Diese unterscheiden sich strukturell vom eigentlichen Ghrelin entweder in der Acylierung oder in der Anzahl der Aminosäuren.

Bei der enzymatischen C-terminalen Prozessierung des Proghrelins, besteht die Möglichkeit, dass auch das Arginin²⁸ entfernt wird, so dass ein aus nur 27 Aminosäuren bestehendes Peptid entsteht, an dessen C-Terminus nun ein Prolin steht (Ghrelin[1-27]) (103). Ein ähnliches Phänomen wurde bereits bei der Prozessierung von -neo-Endorphin, das durch Abspaltung der C-terminalen Aminosäure, in diesem Falle allerdings Lysin, durch ein Carboxypeptidase B-ähnliches Enzym in β -neo-Endorphin

überführt werden kann (234). An dessen Carboxyende wiederum steht, wie beim Ghrelin[1-27], ein Prolin, dessen Bindungseigenschaften als sehr stabil und als relativ unempfindlich gegenüber derartigen Proteasen gelten (103). Daher ist es wahrscheinlich, dass auch im Falle der Prozessierung von Ghrelin ein der Carboxypeptidase B ähnliches Enzym involviert ist. Untersuchungen von Hosada und Mitarbeitern zeigten, dass im menschlichen Magen das Verhältnis der Ghrelinpeptide mit 27 Aminosäuren zu denen mit 28 etwa 1:3 entspricht (103). Die physiologische Bedeutung von Ghrelin[1-27] ist noch unbekannt.

Die Acylierung des Serins in Position 3 erfolgt beim Ghrelin mit Oktansäure durch ein noch unbekanntes Enzym. Daneben wurden auch mit Dekansäure und Dekensäure veresterte Formen beobachtet, die der klassischen oktanoylierten Form in der Fähigkeit, die GH-Freisetzung in vivo zu stimulieren wohl äquipotent sind (103). Diese Fähigkeit jedoch fehlt den nicht acylierten Formen (103). In neueren Untersuchungen konnte allerdings in vitro eine Wirkung auf Cardiomyozyten (12) und Brustkrebszellen (42) nachgewiesen werden, so dass die These, des-acyl-Ghrelins seien gänzlich ohne biologische Aktivität verworfen werden muss. Vielmehr scheint es so zu sein, dass die Acylierung für die Wirkung am GHS-R1a, und somit u.a. für die endokrine Funktion unentbehrlich ist, während an noch unbekanntem weiteren Rezeptoren auch die Bindung der des-acyl Ghrelins möglich ist (12).

[1-28] Ghrelins	[1-27] Ghrelins
oktanoyl ghrelin	oktanoyl ghrelin [1-27]
dekanoyl ghrelin	dekanoyl ghrelin [1-27]
decenoyl ghrelin	
des-acyl ghrelin	des-acyl ghrelin[1-27]

Tabelle 2: Übersicht über beim Menschen nachweisbare Ghrelinderivate

4.1.4. Des-Gln¹⁴-Ghrelin

Neben Ghrelin und seinen Derivaten existiert ein zweiter endogener Ligand des GHS-R, der im Jahr 2000 ebenfalls von der Forschergruppe um Hosada und Kojima, den

Entdeckern des Ghrelins, beschrieben wurde: das des-Gln¹⁴-Ghrelin (102). Es unterscheidet sich von Ghrelin nur durch das Fehlen des Glutamins an Position 14. Obwohl auch dieses Peptid genomisch durch das Ghreligen repräsentiert ist, handelt es sich nicht um ein einfaches Derivat. Vielmehr besitzt es eine eigene Präpro-mRNS, die durch alternatives Splicen entsteht (102). Beim Menschen konnten bislang im Magen nur sehr geringe Mengen an Präpro-des-Gln¹⁴-Ghrelin, dem 116 Aminosäuren langen Vorläuferpeptid, gefunden werden und das eigentliche des-Gln¹⁴-Ghrelin war gänzlich nicht nachweisbar (103). Bei anderen Spezies wurden höhere Konzentrationen an Präpro-des-Gln¹⁴-Ghrelin beobachtet; so stehen stehen die Präproformen von Ghrelin und des-Gln¹⁴-Ghrelin bei der Ratte im Verhältnis 5:1 und bei der Maus sogar 6:5 (103). Die physiologische Bedeutung dieses GHS-R-Liganden ist bislang unbekannt.

4.1.5. Vorkommen und Lokalisation

Das Vorkommen von Ghrelin konnten in fast allen Organen nachgewiesen werden (88,120), vor allem im Gastrointestinaltrakt (3,54,70,120,185), im Pankreas (57,120), der Leber (120), im Nucleus arcuatus hypothalami (120,132), der Niere (146), der Hypophyse (126), der Plazenta (91) und sogar in Immunzellen (94). Neben der Identifikation eines Ghrelinoms im Pankreas (49) wurde in Einzelfällen über die Ghrelinexpression einiger Tumoren, wie Glucagonomen, Insulinomen (108,231), Karzinoiden des Magens, wie auch des Darms (166), medullären Schilddrüsenkarzinomen (114) und Prostatakarzinomen (109) berichtet.

Der weitaus überwiegende Teil der physiologischen Ghrelinproduktion des Gesamtorganismus ist in der Magenmukosa lokalisiert. Dies wird nicht nur durch Messungen der Ghrelingehaltes verschiedener Gewebeextrakte (120) oder deren Ghrelin mRNA (3) belegt, sondern auch durch die Beobachtung, dass Plasmaghrelinspiegel bei Patienten nach totaler Gastrektomie um 65-80% absinken (3,53), gestützt. Sowohl beim Menschen, wie auch bei der Ratte konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass Ghrelin in den die „X/A-ähnlichen Zellen“ (X/A-like cells), deren Funktion bis dato unklar war, produziert wird (54). Seither werden sie gemäß der Nomenklatur endokriner Zellen in Anspielung auf ihr Hormonprodukt als

„Gr-Zellen“ bezeichnet. Diese finden sich in der Schleimhaut des gesamten Gastrointestinaltrakts, wobei die Zelldichte im Corpus und Fundus des Magens im Vergleich zum Darm deutlich höher ist (185). Die Zellen liegen vor allem am Grund der Magendrüsen und vereinzelt auch im Drüsenhals, während sie im Dün- und Dickdarm in die Epithelien der Krypten und Zotten eingestreut sind (185). Morphologisch können zwei Formen unterschieden werden: Die Zellen vom geschlossenen Typ („closed-type cells“) sind klein, rund und liegen lumenfern in der Mukosa. Hingegen haben die Gr-Zellen des offenen Typs („open-type cells“) einen dreieckigen Aspekt und stehen durch einen zytoplasmatischen Fortsatz im Kontakt mit dem Lumen (185). Die geschlossenen Formen kommen im gesamten Magen-Darm-Trakt vor, während die offenen Zelltypen nur in Dünndarm und Kolon nachweisbar sind (185).

Im menschlichen Blutplasma wurden Ghrelinspiegel von $117,2 \pm 37,2$ fmol/ml gemessen (120). Untersuchungen an der Ratte zeigten, dass der Anteil an des-acyl Ghrelin im Plasma um ein vielfaches höher ist, als der des Ghrelins (101).

4.2. Ghrelinrezeptoren

4.2.1. Das GHS-R-Gen

Der menschliche GHS-Rezeptor wurde 1996 von der Firma Merck isoliert und geklont (104). Genetisch ist der Rezeptor auf dem Chromosom 3 in Position q26.2 lokalisiert (156). Das Gen setzt sich aus zwei durch ein Intron getrennte Exons zusammen und codiert für ein Protein mit sieben transmembranösen Domänen (142). Dabei ist die Information für die Domänen 1-5 auf dem ersten Exon repräsentiert und die der letzten beiden Domänen auf dem zweiten (38). In der Promoterregion finden sich keine typischen TATA-, CAAT- oder GC- Regionen für die Bildung eines Initiationskomplexes, allerdings konnten mögliche Bindungsstellen für einige Transkriptionsfaktoren, unter anderem Teil eines Estrogen-response-element, identifiziert werden (112). Eine regulierender Einfluss auf die GHS-R-Genexpression konnte für Schilddrüsenhormone (113), Glucocortikoide (174,212) und Östrogen (174) experimentell nachgewiesen werden.

4.2.2. Subtypen

In der Literatur wurden bislang zwei GHS-Rezeptoren beschrieben, der GHS-R 1a und der GHS-R 1b. Sie stellen Splicevarianten des gleichen Gens dar. Dabei entsteht der GHS-R 1a in regulärer Weise durch komplette Entfernung des Introns, so dass am Ende des Translationsprozesses das vollständige, sieben Domänen umfassende Protein steht. Durch eine weitere Splicemöglichkeit innerhalb des Introns mit alternativer Polyadenylierungssequenz entsteht die Isoform 1b des GHS-R, der folglich nur die fünf im ersten Exon codierten Domänen umfasst, sowie eine kleine C-terminale akzessorische Aminosäuresequenz besitzt, die durch den Intronrest verursacht ist (142).

Die Beobachtung, dass den des-acyl-Ghrelinen zwar die Bindungsfähigkeit an die GHS-R fehlt, sie jedoch eine biologische Wirkung haben, so zum Beispiel auf das Herz (12) oder auf Tumorzellen (42), legen die Vermutung nahe, dass weitere Rezeptoren für Ghrelin und Ghrelinderivate existieren (12).

4.2.2.1. GHS-R 1a

Der GHS-R 1a gehört zur Gruppe der heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Transmembranrezeptoren und besteht aus 366 Aminosäuren (207). Für synthetische GHS konnte an Hypophysenzellen gezeigt werden, dass die intrazelluläre Signaltransduktion über eine Aktivierung des G-Proteins G_{11} und der Proteinkinase C zu einer Konzentrationserhöhung des freien intrazellulären Calciums führt (44). Obwohl der genaue Wirkmechanismus der GH-Freisetzung für Ghrelin noch nicht experimentell demonstriert wurde, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass er identisch ist. Fernerhin konnte gezeigt werden, dass Ghrelin in somatotropen Hypophysenzellen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Pit-1 (pituitary-specific transcription factor-1), der für die Transkription des GH-Gens essentiell ist (20), führt (84). Diese Eigenschaft könnte auf molekularbiologischer Ebene den GH-freisetzenden Effekt des Ghrelin erklären.

4.2.2.2. GHS-R 1b

Dieser aus insgesamt aus 289 Aminosäuren bestehender Rezeptor unterscheidet sich vom GHS-R 1a durch das Fehlen der letzten drei Domänen und einem zusätzlichen, 24 Aminosäuren langen, vom Intron kodierten Rest. In Anwesenheit synthetischer GHS löst dieser Rezeptor im Gegensatz zu seiner Isoform 1a keine Aktivierung der Proteinkinase C oder Erhöhung intrazellulärer Calciumionen-konzentrationen aus und es ist fraglich, ob GHS überhaupt an den Rezeptor binden (104). Bislang liegen auch keine Ergebnisse über das Bindungsverhalten von Ghrelin am GHS-R 1b vor, so dass die physiologische Rolle dieses Rezeptorsubtypen weiter zweifelhaft bleibt.

4.3. Wirkungen

4.3.1. Wirkungen auf das Endokrinium

4.3.1.1. Wachstumshormon

Die Regulation der Wachstumshormonausschüttung in der Adenohypophyse steht bekanntermaßen unter der Kontrolle mindestens zweier hypothalamischer Faktoren (188): zum einen durch das inhibitorisch wirkende Somatostatin (SRIF), das vor allem im Nucleus periventricularis synthetisiert wird, und zum anderen durch GH-releasing-Hormon (GHRH) als stimulierendem Gegenspieler, welches vornehmlich im Nucleus arcuatus produziert wird (188,213). Der komplizierte Regulationsmechanismus, der letztlich zur pulsatilen GH-Sekretion führt ist noch nicht in allen Einzelheiten geklärt (213), zumal mit Ghrelin nun ein dritter Faktor entdeckt wurde, dessen Wirkungsweise bislang nur bruchstückhaft verstanden ist (7,21,22,27,55,56,86,170,171,173,177,181-183,200,207,211,214,220,249,251,252).

Die Fähigkeit von Ghrelin, die GH-Sekretion zu stimulieren wurde *in vivo* sowohl beim Menschen nach intravenöser Injektion (i.v.) (5,211), als auch bei der Ratte nach i.v. (196), intracerebroventriculärer (i.c.v.) und intraperitonealer (i.p.) (249) Applikation demonstriert. Auch *in vitro* wirkt Ghrelin direkt auf die GH-Freisetzung aus Zellen des

Hypophysenvorderlappens (251). Die Wirksamkeit von Ghrelin ist dosisabhängig (55) und übertrifft im molaren Vergleich sogar die des GHRH; beim Menschen stellt es den stärksten jemals beschriebenen GH-Stimulus dar (177,211).

Basierend auf der Beobachtung, dass der stimulierende Effekt der GHS auf die GH-Sekretion durch Unterbrechung der hypothalamo-hypophysären Bahnen (97,178), sowie durch GHRH-Antagonisten (165) erheblich abgeschwächt wird und bei Patienten mit fehlendem GHRH-Rezeptor sogar gänzlich verschwindet (136), wird der Hypothalamus und nicht die Hypophyse als primärer Wirkort postuliert (66,86,92,147,213). Den GHS wird hierbei eine Triggerfunktion auf GHRH-Neurone im Hypothalamus zugeschrieben, deren Expression von GHS-R bereits experimentell nachgewiesen wurde (215). Obwohl GHS die hypothalamische SRIF-Sekretion nicht inhibieren (127), wird ein funktioneller Antagonismus zum Somatostatin im Hypothalamus und in der Hypophyse diskutiert (86). Inwiefern diese über GHS gewonnenen Erkenntnisse auf Ghrelin übertragbar sind und welche physiologische Relevanz ihnen zukommt, muss jedoch in weiteren Untersuchungen geklärt werden (69). Die theoretisch postulierte Wirkungsähnlichkeit von GHS und Ghrelin gründet sich auf der Annahme, Ghrelin sei der natürliche Ligand des GHS-R1a, dem wohl entscheidenden Rezeptor für die Vermittlung der GH-Sekretion, der durch die GHS lediglich pharmakologisch imitiert wird (22). Fernerhin ist unklar, ob und in welchem Maße auch das peripher zirkulierende, in erster Linie vom Magen freigesetzte Ghrelin bei der physiologischen Regulation der zentralnervösen GH-Sekretion eine Rolle spielt.

4.3.1.2. Weitere Hypophysenhormone

Arvat und Mitarbeiter beobachteten bei intravenöser Injektion eines Ghrelinbolus beim Menschen neben dem zu erwartenden starken Anstieg der Somatotropinspiegel auch einen zwar erheblich schwächeren, aber dennoch signifikanten Anstieg der Plasmakonzentrationen von Adrenocorticotropin (ACTH), Aldosteron, Cortisol und Prolaktin (7). Diese Eigenschaft teilt Ghrelin mit seinen synthetischen Analoga und scheint ausgeprägter zu sein, als bei diesen (7).

Die Fähigkeit der synthetischen GHS, die Sekretion von Prolaktin zu stimulieren, konnte auf eine direkte Wirkung an den mammatropen Zellen des Hypophysenvorderlappens zurückgeführt werden (46), so dass für Ghrelin ebenfalls ein derartiger Mechanismus zu vermuten ist.

Im Gegensatz dazu läuft die Wirkung der GHS auf die ACTH-Sekretion indirekt über zentralnervös vermittelte Mechanismen. Dabei werden neben CRH und Arginin⁸-Vasopressin (AVP) (125,216) auch andere Mediatoren, wie γ -Aminobuttersäure (GABA) diskutiert (6). Da in der menschlichen Nebenniere spezifische GHS-Bindungsstellen gefunden wurden (167) könnte dort ebenfalls eine direkte Wirkung von Ghrelin möglich sein.

Einige Autoren halten die Wirkung von Ghrelin auf das corticotrope und laktotrope System für physiologisch irrelevant und interpretieren es lediglich als Nebeneffekt der starken Aktivierung des somatotrophen Systems (40). Allerdings wurde bei Mäusen eine Bedeutung von Ghrelin für die Verarbeitung von Stressoren im Zusammenhang mit Cortisol beobachtet (9).

4.3.1.3. Endokrines Pankreas

Sowohl normales, als auch neoplastisches Pankreasgewebe exprimieren GHS-R 1a mRNA (1,88,124,166). Die bislang publizierten tierexperimentellen Daten zum Einfluss von Ghrelin auf die Insulinsekretion sind teilweise widersprüchlich. So konnte Ghrelin sowohl bei isolierten Inselzellen (57), als auch *in vivo* die Insulinausschüttung stimulieren (1,128). Hingegen fand sich beim isoliert perfundierten Pankreas durch Ghrelin eine Abschwächung des stimulativen Effektes von Glukose, Arginin und Carbachol (73).

Auch beim Menschen sind die Effekte von Ghrelin auf die Insulinfreisetzung widersprüchlich. Einerseits liegen einige Ergebnisse vor, die einen eindeutigen inhibitorischen Effekt von Ghrelin auf den Insulinspiegel zeigen (50,154,229,247), andererseits konnten dies Caixas und Mitarbeiter in Ihren Experimenten nicht nachweisen (37). Die Arbeitsgruppe um Broglio konnte zeigen, dass Ghrelin beim Menschen eine Hyperglykämie induzieren kann, die paradoxerweise von einer

verminderten Insulinsekretion gefolgt ist (26). Der dafür verantwortliche Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt. Es ist jedoch nicht davon auszugehen, dass dies via GH oder Glukagon geschieht (26). Bekanntermaßen jedoch kann Ghrelin den inhibitorischen Effekt von Insulin auf die Glukoneogenese aufheben (149). Dies, sowie der vermutete direkte stimulative Effekt auf die Glykogenolyse (26) bei gleichzeitiger Insulinsuppression könnte eine mögliche Erklärung für das ghrelininduzierte Auftreten einer Hyperglykämie ohne Gegenregulation durch Insulin sein.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Ghrelin als gastroenteropankreatisches Hormon eine wichtige Rolle in der Feinregulation der Insulinsekretion und im Glukosemetabolismus spielt.

4.3.2. Extraendokrine Wirkungen

4.3.2.1. Verdauungssystem

Die große strukturelle Ähnlichkeit von Ghrelin mit Motilin, wie auch die derer Rezeptoren, GHS-R 1a und Motilin-Rezeptor 1a, legen eine Funktion von Ghrelin im Verdauungstrakt nahe (10,78,106,107,120). Die Expression des GHS-R im Gastrointestinaltrakt gilt als sicher nachgewiesen (88,121,166,201,231).

Für den Menschen konnte eine Korrelation von Ghrelinserumspiegels und der Magenentleerungsgeschwindigkeit gezeigt werden (228). Auch bei anderen Säugetierspezies fördert Ghrelin die Magen-Darm-Motilität (8,83,138,224,225) und beeinflusst die Magensäuresekretion (58,138,202). Hierbei wird abhängig von der Methode sowohl über stimulierende (58,138), als auch über inhibierende Wirkungen (202) auf die Magensäureproduktion berichtet. Dabei besteht jedoch weitgehende Einigkeit darüber dass der Effekt zumindest partiell über zentralnervöse Mechanismen vermittelt wird. Darüber hinaus bestehen Hinweise, dass diese Wirkungen cholinerg vermittelt werden, da sie durch Blockierung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren, wie auch durch Vagotomie aufgehoben werden (138). Fernerhin ist zentralnervös injiziertes Ghrelin in der Lage, Ratten vor durch Ethanol induzierten Mangelulcera zu schützen

(203). Dieser gastroprotektive Effekt scheint auf die Vermittlung durch Stickstoffmonoxid und afferente Vagusfasern angewiesen zu sein (203).

In Bezug auf das exokrine Pankreas wurde für die Ratte gezeigt, dass Ghrelin die durch Cholezystokinin (CCK) induzierte Exkretion *in vivo*, wie auch am isolierten Pankreaslobulus deutlich zu hemmen vermag (253). Dies geschieht auf indirektem Wege, so dass hier wahrscheinlich intrapankreatische Neurone eine vermittelnde Rolle einnehmen (253).

4.3.2.2. Kardiovaskuläres System

Das reichhaltige Vorkommen von Bindungsmöglichkeiten für GHS im Herzen und im Gefäßsystem beim Menschen wie auch bei der Ratte ist seit einigen Jahren sicher nachgewiesen (42,88,121,147). In Aorta und Herz der Ratte konnte GHS-R 1a mRNS nachgewiesen werden (152). Durch Radiomarkierung wurden spezifische Bindungsmöglichkeiten für Ghrelin und die vermehrte Expression dieser Rezeptorstrukturen bei Atherosklerose gezeigt; beim Menschen lagen diese vor allem in der Aorta, den Koronararterien, den pulmonalen Gefäßen, den Arteriae arcuatae renales und der Vena saphena (115-117). Aufgrund des unterschiedlichen Bindungsverhaltens von Peptidyl-GHS, non-peptidyl-GHS und Ghrelin in kardiovaskulären Geweben wird über die Existenz einer weiteren GHS-R-Subpopulation spekuliert (19,164,167).

Die synthetischen GHS zeigen eine Reihe faszinierender, auch therapeutisch interessanter kardiovaskulärer Effekte: Bei Ratten zeigt sich nach Verabreichung von GHS eine verbesserte Herzfunktion nach Myokardinfarkt (217) und Hexarelin besitzt kardioprotektive Eigenschaften bei GH-defizienten Ratten mit postischämischer ventrikulärer Dysfunktion (60). Auf der anderen Seite wurde bei Injektion einer hohen Dosis von Peptidyl-GHS über eine vorübergehende Vasokonstriktion der Koronargefäße am perfundierten Rattenherz berichtet (19). Bei Schweinen mit dilatativer Kardiomyopathie wirken GHS positiv inotrop (118). Hexarelin erhöht die Ejektionsfraktion bei gesunden Probanden (18), Patienten mit Hypopituitarismus (17) und Patienten mit ischämisch bedingter dilatativer Kardiomyopathie (28), ohne dabei zu

Veränderungen von Blutdruck, Herzfrequenz oder Katecholaminspiegel zu führen. Jedoch weisen experimentelle Daten bezüglich antiischämischer kardioprotektiver Effekte Ghrelin, im Vergleich zu den synthetischen GHS, eine untergeordnete Rolle zu (221). Allerdings wurden auch bei Ghrelin Wirkungen auf das Herz-Kreislauf-System beobachtet. So wurde für GH-defiziente Ratten und solche mit chronischer Herzinsuffizienz bei langfristiger Behandlung mit Ghrelin über eine verbesserte kardiale Inotropie bei verminderter Nachlast berichtet (154). Beim gesunden Menschen und bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz senkt Ghrelin signifikant die Nachlast und erhöht den Herzindex (152,153). Dabei erniedrigt Ghrelin den mittleren arteriellen Blutdruck, ohne Beeinflussung von Herzfrequenz oder mittlerem Pulmonalarteriendruck. Dieser hypotensive Effekt, der unabhängig von GH-IGF-I und NO zu sein scheint (163) führt zu leicht erhöhtem Adrenalinpiegel bei unverändertem Noradrenalinpiegel (152,153). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch Ghrelin hervorgerufene verbesserte Herzfunktion entweder auf die arterielle Vasodilatation und die damit verbundene Nachlastsenkung oder die erhöhten Adrenalinpiegel zurückzuführen ist (29).

4.3.2.3. Tumoren

Bindungsmöglichkeiten für GHS wurden in neoplastischen endokrinen, wie auch nicht-endokrinen Geweben nachgewiesen (29). Ähnlich wie im kardiovaskulären System wurden auch bei Tumorzellen Effekte beobachtet, die sowohl durch Ghrelin, als auch durch die des-acylierte Form vermittelt werden, obwohl die aliphatische Seitenkette für die Bindung am GHS-R 1a essenziell ist, was die Hypothese der Existenz weiterer Rezeptorsubtypen stützt (147). Bemerkenswerterweise gibt es Gewebe, wie etwa bei der Mamma, die erst bei Entartung GHS-Rezeptoren exprimieren (42), während bei Fibroadenomen und normalem Parenchym keine Bindungsmöglichkeiten für Ghrelin gefunden wurden (42,167). Die relative Dichte an GHS-Rezeptoren beim Mammakarzinom ist am höchsten bei der gut differenzierten (G1) invasiven Form und nimmt mit steigendem Entdifferenzierungsgrad (G2,G3) ab. Für die *in vitro* Wirkung exogenen Ghrelins auf verschiedene Brustkrebszelllinien liegen unterschiedliche Ergebnisse vor: Während Cassoni eine Proliferationshemmung bei einigen Zelllinien

(MCF-7, T47D, MDA-MB 231) beschreibt (42), konnte dieser Effekt durch Jeffrey an den Zelllinien MDA-MB 231, MDA-MB 435 und MCF-7 nicht reproduziert werden, so dass die Ergebnisse von Cassoni möglicherweise auf die Zytotoxizität der von ihm eingesetzten unphysiologisch hohen Ghrelinkonzentrationen zurückzuführen sein könnten (110).

Mit Ausnahme der medullären Schilddrüsenkarzinome exprimieren alle anderen Karzinome der Schilddrüse wie auch in geringerem Umfang normales Schilddrüsengewebe GHS-Rezeptoren (41). Für synthetische GHS vom peptidyl- und non-peptidyl-Typ wurde ein antiproliferativer Effekt auf papilläre, follikuläre und anaplastische Schilddrüsenkarzinome in vitro beschrieben (41); der Nachweis für Ghrelin im Speziellen steht noch aus.

Bei den Tumoren der Lunge gibt es Hinweise, dass nicht nur Bronchialkarzinoide, sondern auch Adenokarzinome Bindungsstellen für GHS exprimieren (147), wie dies auch bei der Lungenkrebszelle CALU-1 der Fall ist. Deren Proliferation wird nur durch peptidyl-GHS gehemmt, für Ghrelin liegen noch keine Daten vor (85).

Die Koexpression von Ghrelin und GHS-Rezeptoren könnte für das Verständnis der Pathogenese einiger Tumorleiden entscheidend sein, da bei vorausgesetzter und noch zu beweisender proliferationsfördernder Wirkung von Ghrelin autokrin oder parakrin eine ungehemmte Eigenstimulation entarteter Zellen vonstatten gehen könnte (110). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass Ghrelin über die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK) zu beschleunigtem Wachstum der Hepatom-Zellreihe HepG2 führt (149). Die Aktivierung dieses Enzyms scheint prinzipiell für die Tumorgenese eine wichtige Rolle zu spielen und wurde bei Karzinomzellreihen von Pankreas, Kolon, Lunge, Ovar und Niere sowie bei Primärtumoren von Niere, Kolon und Lunge beobachtet (100); bei all diesen Geweben ist die Koexpression von Ghrelin und GHS-Rezeptoren bekannt (110).

Auch für die Hypophyse, bei der ebenfalls die Koexpression von Ghrelin und seinem Rezeptor nachgewiesen ist, wird ein auto- oder parakriner positiver Rückkopplungseffekt bei der Entstehung von Adenomen vermutet (14,110,124,126). Die Beobachtung, dass

die GHS-R mRNA Expression in Adenomen gegenüber Normalgewebe etwa um das zweihundertfache gesteigert ist, unterstreicht erneut die mögliche Bedeutung dieses Rezeptors (205).

Bei Untersuchungen mit Prostatakrebszellen konnte das gemeinsame Vorkommen von GHS-R 1a und Ghrelin für die Zellreihen ALVA-41, DU 145, LNCaP und PC-3 nachgewiesen werden, bei letzterer steigert exogenes Ghrelin *in vitro* die Proliferationsrate um ein Drittel (109).

Neuere molekularbiologische Untersuchungen geben ebenfalls Hinweise auf die Involvierung Ghrelins in die Tumorgenese. So wurde festgestellt, dass Prostatakarzinome mit Genamplifizierung im Bereich von 3q25-27, also der Genregion, die auch für Ghrelin und GHS-R codiert, ein erhöhtes Tumorstadium aufweisen (186). Außerdem vermuten Sugita und Mitarbeiter aufgrund genetischer Untersuchungen an Cervix-, Ovarial- und Lungenkarzinomen die Existenz eines Onkogens am Genlocus 3q26.2, eben jenem Ort, an dem auch das GHS-R-Gen zu finden ist (210).

In der Zusammenschau lässt sich jedoch keine eindeutige Aussage zum Verhalten Ghrelins in Bezug auf die Tumorstadium treffen, da sowohl proliferative als auch antiproliferative Effekte Ghrelins teilweise sogar bei Zelllinien der gleichen Tumorentität beschrieben werden (41). In Anbetracht der Vielzahl von Veröffentlichungen über den Einfluss Ghrelins auf Tumorzellen, scheint eine Beeinflussung des Zellzyklus durch Ghrelin, zumindest bei pathologisch veränderten Zellen sehr wahrscheinlich, was in weiteren Studien genauer auszuarbeiten ist.

4.3.2.4. Verhalten und Psyche

Bei Mäusen konnte nach intracerebroventrikulärer und intraperitonealer Injektion von Ghrelin ein deutliches Angstverhalten induziert werden, welches durch gleichzeitiges Verabreichen eines Antagonisten am Rezeptor für Corticotropin-releasing-Hormon (CRH) signifikant gemindert werden konnte (9). Diese Ergebnisse weisen Ghrelin eine mögliche Funktion in der Verarbeitung von Stressoren auf neuroendokriner und

Verhaltensebene zu und führen zu Spekulationen über die Rolle des Magens, nicht nur in der Regulation von Hunger, sondern auch in der Regulation des emotionalen Erlebens (9).

Fernerhin scheint Ghrelin modifizierend auf den Schlaf-Wach-Rhythmus (218) und die Schlafphasen (160) bei Ratten einzuwirken, wobei hier Schwierigkeiten bestehen, zwischen direktem Effekt und indirekter Wirkung über die Beeinflussung des Fressverhaltens und der damit verbundenen metabolischen Konsequenzen zu differenzieren (218). Beim Menschen zeigen Untersuchungen des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie in München an Probanden im Schlaflabor eine Verlangsamung des Schlaf-EEGs nach wiederholten Ghrelininjektionen, sowie eine Verringerung der REM-Schlafphasen im weiteren Schlafverlauf (237).

4.3.3. Ghrelin und Metabolismus

4.3.3.1. Energiehomöostase

Das Körpergewicht, das durch genetische, wie auch umweltbedingte Faktoren beeinflusst ist, wird beim Gesunden durch äußerst genaue Regulationsmechanismen in engen Grenzen gehalten. Obwohl deutliche Variationen des Energieungleichgewichts von Tag zu Tag bei den meisten Menschen vorkommen, wird dies über einen längeren Zeitraum kompensiert, so dass bei über einer Million konsumierter Kilokalorien pro Jahr bis auf etwa 1% genau ausgeglichen wird (79,236). Der ursächliche, als Energiehomöostase bezeichnete Prozess stellt die auf Veränderung des Körpergewicht folgende reaktive Adaptation der Energieaufnahme durch Hungergefühl auf der einen, und des Verbrauchs, d.h. des Grundumsatzes auf der anderen Seite dar, mit dem Ziel, den Sollwert wiederherzustellen (129,204,236). Dies führt beispielsweise dazu, dass der Versuch, durch eine Diät abzunehmen, zwangsläufig zu vermindertem Grundumsatz, sowie gesteigertem Appetit führt und zwar proportional zum Gewichtsverlust, was zur Rezidivneigung der Adipositas nach Diät beiträgt (81). Das Modell der Energiehomöostase impliziert das Vorhandensein eines Rückmeldungsmechanismus der peripher im Körper gelegenen Nahrungsspeicher an das Zentralnervensystem, das mit

seinen vegetativen Anteilen die Steuerungszentrale der genannten Regulationsmechanismen darstellt (193). Die tierexperimentellen Untersuchungen von Woods und Mitarbeitern über die Wirkungen zentral applizierten Insulins wiesen erstmals auf eine tragende Rolle dieses Hormons für den Rückkopplungsmechanismus hin (245). Obgleich die Proportionalität von Körpergewicht und Insulinspiegel eindeutig nachgewiesen ist, ist der Beweis, dass Insulin im Zentralnervensystem zu einer Verringerung des Körpergewichts führt, ungleich schwieriger, da das Hormon über seine periphere Wirkung einen genau entgegengesetzten Effekt erzielt (143,195). Erst kürzlich konnte diese These durch aufwendige molekularbiologische und pharmakologische Studien an Nagetieren gestützt werden: Bruning und Mitarbeiter konnten beobachten, dass die spezifische Deletion des Insulinrezeptors in Nervenzellen zu vermehrter Nahrungsaufnahme und Erhöhung des Körperfettanteils führt (34). Denselben Effekt konnte die Arbeitsgruppe um Obici durch die perihypothalamische Injektion von Antisenseoligonukleotiden des Insulinrezeptors, die zur Aufhebung der Biosynthese des Rezeptors führt, beobachten (161). Auf der anderen Seite konstatierten Air und Mitarbeiter eine Reduktion von Körpergewicht und Nahrungsaufnahme nach Injektion von Insulinanaloga, die leichter die Blut-Hirn-Schranke überwinden als das natürlich vorkommende Hormon (2).

Mit der Entdeckung von Leptin durch Friedmann 1994, wurde ein weiterer Faktor gefunden, der zweifelsohne eine tragende Rolle in diesem Rückkopplungssystem spielt (254). Dieses vom Fettgewebe synthetisierte Hormon zeigt wie Insulin eine Proportionalität von Plasmaspiegel und Fettreserven im Körper (48,82). Leptin ist in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (194), um dort in Interaktion mit Leptin-Rezeptoren (LepR) zu treten, die nachgewiesenermaßen von Neuronenpopulationen exprimiert werden, die an der Regulation der Energiebalance beteiligt sind (195). Aufgrund der derzeit vorliegenden experimentellen Daten wird von einigen Autoren die Bedeutung des Leptins bei der Energiehomöostase für wichtiger als die des Insulins gehalten (51,195). So scheint Leptin für die adäquate Regulation des Körpergewichts unverzichtbar zu sein, denn Nager (82) wie auch Menschen mit inaktivierenden Mutationen des Leptin-Gens (145) oder des Leptin-Rezeptors (47) weisen eine massive Adipositas und Hyperphagie auf. Biochemische Untersuchungen von Niswender deuten

auf eine Verschaltung der intrazellulären Signalkaskade des Insulin- und des Leptinrezeptors auf Ebene der Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI-3-Kinase) hin (158).

Die hypothetische Vermutung, der krankhaften Adipositas läge pathogenetisch ein Leptinmangel zugrunde, lies die Hoffnung aufkeimen, durch Leptinsubstitution endlich eine suffiziente Pharmakotherapie der Adipositas entwickeln zu können. Jedoch zeigte sich schnell, dass bei adipösen Patienten kein Leptinmangel vorliegt und die exogene Zufuhr von Leptin bei Adipösen zu einer geringeren Verminderung des Appetits führt als dies bei normalgewichtigen Probanden der Fall ist (48,96). Diese Beobachtung führte zu der Theorie, dass der Adipositas kein Leptinmangel zugrunde liegt, sondern vielmehr eine Leptinresistenz, ähnlich der Insulinresistenz beim Diabetes mellitus Typ II (96).

4.3.3.2. Regulation des Körpergewichts im ZNS

An der zentralnervösen Regulation des Körpergewichts sind zahlreiche Neuropeptide beteiligt, die anhand ihre jeweiligen katabolen oder anabolen Eigenschaft in zwei Gruppen eingeteilt werden können (195). Dabei bewirken die katabolen Neuropeptide, deren Freisetzung durch Insulin und Leptin stimuliert wird über Verminderung des Appetits und Erhöhung des Energieverbrauchs eine Verringerung des Körpergewichtes. Hingegen zeigen die anabolen Neuropeptide gegenläufige Effekte und unterliegen in ihrer Freisetzung der Inhibition durch Leptin und Insulin (51). Fernerhin besteht die Möglichkeit, die Neuropeptide nach ihrem anatomischen Expressionsort einzuteilen. Dabei ist entscheidend, ob die jeweiligen Nervenzellen direkt durch Insulin und Leptin reguliert werden, d.h. Neurone ersten Grades sind, oder ob die Nervenzellen im neuronalen Integrationsprozeß nachgeschaltet sind, d.h. zweit- oder höhergradig sind (51).

Die Nervenzellen erster Ordnung befinden sich im Nucleus arcuatus hypothalami, in dem reichlich Rezeptoren für Leptin und Insulin nachgewiesen wurden (192). Klassische Transmitterpeptide dieser Neurone sind das katabol wirkende Proopiomelanocortin (POMC), sowie das anabole Neuropeptid Y (NPY) und Agouti-related-Protein (AgRP). Die weitere Verarbeitung der Informationen zur Steuerung des Energiehaushaltes erfolgt

vor allem in Subzentren des Hypothalamus, perifornikalen Neuronen, dem Hirnstamm und der Hypophyse (51). Dem lateralen Anteil des Hypothalamus und dem benachbarten perifornikalen Bereich wird dabei die Funktion eines „Hungerzentrums“ zugeschrieben, da die elektrische Stimulation dieser Gehirnregion zu Adipositas und Hyperphagie führt, die Schädigung hingegen genau gegenteilige Effekte zeigt (25). Sowohl die NPY/AgRP-Neurone, wie auch die POMC-Neurone projizieren in diese Areale und treten dort monosynaptisch in Kontakt zu Nervenzellen, die anabole Neuropeptide exprimieren, wie beispielsweise Melanin-concentrating-hormone (MCH), Orexin A und Orexin B (74). Die von dort aus zu verschiedenen Regionen des Kortex ziehenden Efferenzen tragen zum Auftreten eines Hungergefühls bei (74). Außerdem wird die zusätzliche Verminderung des Energieverbrauchs durch eine supprimierende Wirkung von MCH auf die Schilddrüsenfunktion diskutiert (199). Auf der anderen Seite bestehen zahlreiche axonale Verbindungen der NPY/AgRP- und POMC-Neurone zum Nucleus paraventricularis hypothalami (74,195). Da die Beschädigung dieses Gehirnareals zu Hyperphagie und Fettleibigkeit führt, wird hier der Sitz eines „Sättigungszentrums“ vermutet. Diese Aufgabe wird durch Efferenzen zum Kortex und durch die Freisetzung von TRH und CRH aus den Axonen in der Hypophyse erfüllt. Diese beiden hypothalamischen Releasinghormone steigern den Energieverbrauch bei gleichzeitiger Verminderung der Nahrungsaufnahme durch Stimulation der Schilddrüse, bzw. durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems (25).

Voraussetzung für die Steuerung der Gesamtnahrungsaufnahme durch Leptin und Insulin ist die Beeinflussung von Umfang und Frequenz der Einzelmahlzeiten, also der Entscheidung des Individuums, den Zeitpunkt des Beginns, wie der Beendigung der Nahrungsaufnahme festzulegen. Das Völlegefühl, welches wesentlich an der Entscheidung zur Beendigung der Nahrungsaufnahme beteiligt ist, resultiert aus mechanischen, neuronalen und humoralen Signalen des Magen-Darm-Trakts, die vor allem im Stammhirn verarbeitet werden. Zahlreiche Publikationen deuten auf den Nucleus tractus solitarii als Hauptangriffspunkt derartiger Sättigungssignale hin (51). Zu diesen Signalen gehören z.B. die Magendehnung und auch enterische Neuropeptide, wie Cholezystokinin, Glukagon, Glucagon-like-peptide 1, Amylin, Bombesin-related peptides, Apolipoprotein A-IV und möglicherweise Enterostatin (206,243). Leptin scheint über verschiedene Wege die Ansprechbarkeit des Stammhirns für

Kurzzeitsättigungssignale zu beeinflussen. Neben direkten, monosynaptischen Verbindungen der Neurone ersten Grades zu den Kerngebieten im Hirnstamm, die an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind, bestehen auch indirekte mit Zwischenschaltung sekundärer Zentren, wie dem Nucleus periventricularis und den lateralen Hypothalamusanteilen (51). Daneben wird eine teilweise direkte Wirkung von Leptin im Stammhirn diskutiert (89,90). Folglich führt die Reduktion körpereigener Fettdepots durch die konsekutiv sinkenden Leptin- und Insulinspiegel zu verminderter Wirksamkeit o.g. Kurzzeitsättigungssignale und damit zu vermehrter Nahrungsaufnahme (52).

Fernerhin kommen in einigen Kerngebieten des Hirnstamms, wie z.B. dem Nucleus tractus solitarii, dem Nucleus motorius dorsalis nervi vagi und der Area postrema Rezeptorstrukturen für zahlreiche metabolische Signale vor; darunter finden sich Rezeptoren für Insulin, Leptin, Neuropeptid Y, Proopiomelanocortin und Melanocortin (51). Darüber hinaus zeigt die Verabreichung von Leptin oder Melanocortin in den Hirnstamm ähnliche Phänomene wie die hypothalamische Injektion (89). Diese Beobachtungen deuten auf die Involvierung des Stammhirns in der Regulation der Langzeit-Energiehomöostase hin (89).

4.3.3.3. Ghrelin

Im Gegensatz zu den relativ gut verstandenen postprandialen Sättigungsmechanismen, ist über die Vermittlung des Hungergefühls, das zum Beginn der Nahrungsaufnahme führt, wenig bekannt (52). Campfield und Smith beobachteten, dass kurz vor der Nahrungsaufnahme ein kurzzeitiger und vorübergehender Abfall des Blutzuckerspiegels um etwa 11% eintritt (39). Jedoch wird die physiologische Relevanz dieses Phänomens für den Menschen durch andere Untersuchungen in Frage gestellt (52,176). Das Magenhormon Ghrelin scheint hingegen sowohl bei der Kurzzeit-, als auch der Langzeitregulation von Nahrungsaufnahme und Energiehaushalt eine Schlüsselrolle zu spielen.

Schon vor der Entdeckung von Ghrelin gab es experimentelle Hinweise, dass die GHS zu erhöhter Nahrungsaufnahme führen, die jedoch sehr kontrovers diskutiert und

keinesfalls allgemein akzeptiert wurden (131,162,222,223). Fernerhin wurde in einer Vielzahl an Publikationen von durch GHS aktivierten Nervenzellen in Bereichen des Hypothalamus, denen eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Nahrungsaufnahme und Energiehaushalt zugeschrieben wird, berichtet (11,62-68,99,134,239). Die Expression des GHS-R auf derartigen Neuronen gilt als sicher nachgewiesen (104,142,239). Die Kontroverse um die umstrittene orexigene Wirkung der GHS-R-Agonisten wurde erst mit der Entdeckung Ghrelins als dem natürlichen Liganden dieses Rezeptors, der einen der stärksten adipogenen und orexigenen physiologischen Faktoren darstellt, die jemals bei Säugetieren gefunden wurden (22,106,226,249). So wurde beobachtet, dass die Verabreichung von Ghrelin bei Nagetieren zur Gewichtszunahme führt (155,226,227,248). Dabei scheint die Wirkung von Ghrelin direkter Natur, also unabhängig von dem stimulierenden Effekt auf die Freisetzung von Wachstumshormon zu sein. Während bei dem Weg über GH in erster Linie ein erhöhtes Wachstum von knöchernem Skelett und Muskelgewebe zu erwarten wäre (130,238), zeigt Ghrelin in den Versuchen vor allem eine Vermehrung der Fettdepots bei weitgehend unveränderter Knochen- und Muskelmasse (226).

5. Spezielle Diskussion

5.1. Allgemeines zur Regulation der Ghrelinsekretion

Während die Wirkungen von Ghrelin auf verschiedenste Funktionen und Organe des Organismus Gegenstand vieler wissenschaftlicher Publikationen darstellt, ist die Regulation der Ghrelinsekretion selbst weitgehend noch unbekannt. Obgleich Ghrelin in Zellen nahezu aller Organe nachgewiesen werden konnte, befinden sich die Mehrzahl aller Gr-Zellen im Magen (siehe 4.1.5) und eine Gastrektomie führt beim Menschen zu einer Reduktion des Ghrelinspiegels um etwa 70-80% (3,53). Es ist daher davon auszugehen, dass die im Plasma gemessenen Ghrelinkonzentrationen im Wesentlichen die gastrale Ghrelinsekretion widerspiegeln.

Die Ghrelinkonzentration steigt kurzfristig bei Nahrungskarenz an und fällt nach Nahrungsaufnahme wieder ab (75,197,226,228). Daher ist anzunehmen, dass die Kurzzeitregulation der Ghrelinsekretion im Wesentlichen von metabolischen Faktoren abhängig ist, die am wahrscheinlichsten durch gastrointestinale neuroendokrine Prozesse vermittelt werden. Bei Aufnahme von kohlenhydratreicher Nahrung lässt sich bei Menschen und Nagetieren ein rascher Abfall des Ghrelinspiegels beobachten, der schnell wieder auf interdigestives Basalniveau ansteigt (50,197,226,228). Dadurch unterscheidet sich Ghrelin vom Verhalten der meisten anderen gastrointestinalen Hormone, die sich durch einen postprandialen physiologischen Anstieg auszeichnen (188). Darüber hinaus führt proteinreiche Nahrung beim Menschen zu einem Anstieg der Ghrelinsekretion (75). Bei Ratten hingegen scheint eine proteinarme Diät über einen längeren Zeitraum zum Anstieg und eine fetthaltige Diät zum Abfall der Plasmaghrelinkonzentration zu führen (128). Die alleinige Dehnung des Magens allerdings zeigt keine Wirkung (75,197,226). Die für diese bemerkenswerten

nährstoffabhängigen Phänomene verantwortlichen Regulationsmechanismen sind bislang unbekannt, deuten jedoch auf eine komplexe endokrine Steuerung hin.

Für die Höhe des basalen Ghrelinspiegels ist der Ernährungszustand ausschlaggebend: Es besteht eine negative Korrelation mit dem Body-Mass-Index (BMI = Körpergewicht in kg dividiert durch das Quadrat der Körperlänge in m) (3,93,197,229). So lässt sich bei Anorexia nervosa und Kachexie eine gesteigerte Ghrelinsekretion beobachten, während bei Adipositas der Plasmaghrelinspiegel vermindert ist und sich durch Reduktion des Körpergewichts normalisieren lässt (15,53,179,219). Damit ist das Verhältnis von Ghrelinspiegel und Ernährungszustand dem Leptinspiegel genau entgegengesetzt, so dass vermutet wird, dass diese beiden Hormone jeweils antagonistisch an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt sind (50,147).

5.2. Nervus vagus und cholinerges System

Die parasympathische Steuerung gastroentero-pankreatischer Funktionen erfolgt im Wesentlichen über den Nervus vagus (111). Er verbindet dabei über seine afferenten und efferenten Fasern das Zentralnervensystem bidirektional mit dem Verdauungssystem. Unter der Vielzahl unterschiedlicher Transmittersysteme dieses vegetativen Nervens kommt dabei Acetylcholin eine herausragende Rolle zu. Die Anwesenheit cholinergischer Nervenendigungen des N. vagus in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Magendrüsen, dem Hauptort der G-Zellen, lassen einen regulativen Einfluss des Nerven aus anatomischer Sicht möglich erscheinen (119). Fernerhin ist bekannt, dass die Aktivierung des N. vagus im Magen u.a. zu vermehrter Freisetzung von Gastrin und verminderter Somatostatinsekretion führt (141,157). Daher wäre auch eine indirekte, durch diese Hormone medierte Beeinflussung der Ghrelinsekretion durch den N. vagus aus theoretischer Sicht durchaus denkbar. Ebenso könnte die durch Vagusstimulation induzierte Säureproduktion im Magen und der dadurch ausgelösten Abfall des intraluminalen pH-Wertes ebenfalls die Freisetzung von Ghrelin verändern, in ähnlicher Weise, wie dies bei anderen Magenormonen bereits demonstriert wurde (98,233).

Kürzlich berichteten Lee und Mitarbeiter von Versuchen, die zeigten, dass bei Ratten eine Vagotomie nach zwei Wochen einen um das Dreifache erhöhten Ghrelinspiegel im Plasma bewirkt (128), was zu der Vermutung führte, die Ghrelinsekretion stünde unter tonischer Vagusinhibition. Auf der anderen Seite hat, wie von Muramaki und Mitarbeitern gezeigt, die zervikale Vagusstimulation keine akute Wirkung auf die Ghrelinausschüttung bei narkotisierten Ratten (148). Beim Menschen hat die vagale Aktivierung in Form von Scheinmahlzeiten („sham feeding“) keinen messbaren kurzfristigen Einfluss auf die Ghrelinkonzentration im Blutplasma (75). Dem widersprechen die experimentellen Ergebnisse einer japanischen Forschergruppe, die bei Schafen während einer zweistündigen Scheinmahlzeit zunächst einen Abfall, später einen leichten Anstieg der Plasmaghrelinspiegel gemessen haben. Dieselbe Arbeitsgruppe berichtet darüber hinaus auch von einem Anstieg der Ghrelinsekretion etwa eine Stunde vor Beginn ihrer Mahlzeit, die täglich zu einem festen Zeitpunkt verfüttert wird. Nach aktuellem Wissensstand unterliegen die gastrointestinalen Phänomene in dieser als cephal bezeichneten Phase der Nahrungsaufnahme in erster Linie der Steuerung durch den Nervus vagus, so dass der Anstieg der Plasmaghrelinkonzentration der Schafe in Erwartung ihrer Mahlzeit als ein vagal vermittelter konditionierter physiologischer Reflex interpretiert werden könnte (208). Fernerhin lässt sich der durch Hungern provozierte Anstieg der Ghrelinkonzentration bei Ratten durch subdiaphragmale Vagotomie verhindern und durch Atropin deutlich vermindern (240).

Die vorliegenden Daten zeigen, dass beim isolierten Organ die elektrische Reizung des Nervus vagus zu einer Stimulation der Ghrelinsekretion führte. Diese war weitgehend unabhängig von der applizierten Frequenz und dem intraluminalen pH-Wert. Auch die von Williams und Mitarbeitern publizierten Ergebnisse, die zeigen, dass subdiaphragmale Vagotomie den Anstieg von Ghrelin bei hungernden Ratten verhindert, weisen auf eine stimulierende Wirkung des Nervus vagus hin (240). Die zuvor auf der Grundlage von *in vivo* - Versuchen beschriebene inhibitorisch-tonische Funktion des Nervus vagus ist deshalb höchstwahrscheinlich Ausdruck komplexer Regulationsprozesse unter Einbeziehung von extragastralen Strukturen, die im isolierten Organmodell ausgeschaltet sind. Ferner könnte die Vagotomie und die dadurch sekundär ausgelösten Prozesse in der Kurz- und Langzeitbeobachtung zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Außerdem

sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit, wie letztlich auch die zuvor beschriebenen Ergebnisse von Muramaki (148) und Erdmann (75) nicht für die Hypothese, dass vagale Mechanismen am postprandialen Abfall des Ghrelinspiegels beteiligt sind. Außerdem sind die Daten gut vereinbar mit der von Sugino und Mitarbeitern geäußerten Vorstellung eines vagal vermittelten präprandialen Anstieg der Plasmaghrelinsekretion in der cephalen Phase (208).

Acetylcholin ist ein Neurotransmitter von zentraler Bedeutung für die Regulation endokriner und exokriner Prozesse im Verdauungssystem (45,87). Einige der wichtigsten Wirkungen von Ghrelin, wie die Erhöhung von Motilität und Säureproduktion im Magen oder die Zunahme des Körpergewichts werden durch das cholinerge System vermittelt (56,138,240). Durch verschiedene Studien am Menschen und an Säugetieren wurde bereits versucht, die Wertigkeit cholinerg Fasern für die neuroendokrine Steuerung der Ghrelinfreisetzung selbst zu bewerten. Eine Untersuchung von Sugino und Mitarbeitern wurde an Schafen durchgeführt, bei denen der zeitliche Verlauf der Ghrelinsekretion bei der Fütterung unter Behandlung mit Atropin, einem kompetitiven Acetylcholinantagonisten am muskarinischen ACh-Rezeptor (119), sowie Hexamethonium, einem Antagonisten am nikotinischen, also ganglionären Rezeptor (36) beobachtet wurde. Dabei zeigte sich, dass der in der Kontrollgruppe beobachtbare postprandiale Abfall des Ghrelinspiegels bei den mit Atropin oder Hexamethonium behandelten Tieren ausblieb. Das in dieser Studie ebenfalls untersuchte Metocloperamid, einem durch Hemmung der Acetylcholinesterase indirekt agonistisch wirkenden Pharmakon (135), zeigte hingegen keinen Effekt. Die Autoren der Studie interpretieren ihre Ergebnisse als Hinweis auf eine supprimierende Wirkung des cholinergen Systems auf die Ghrelinsekretion (209). Dem stehen jedoch die Ergebnisse von Broglio und Mitarbeitern entgegen, die den Einfluss von Pirenzepin, einem muskarinischen Antagonisten, und Pyridostigmin, einem indirekten cholinergen Agonisten auf die Plasmaghrelinspiegel sechs gesunder Männer untersuchten. Dabei zeigte sich, dass Pyridostigmin zu erhöhten, Pirenzepin dagegen zu erniedrigten Plasmaghrelinspiegeln führen (30). Diese Ergebnisse stehen zwar im Gegensatz zu den Versuchen der Arbeitsgruppe von Sugino, sind jedoch gut vereinbar mit den von Williams und Mitarbeitern veröffentlichten (30,240), so dass die Unterschiede entweder als speziesspezifisch anzusehen sind oder aber es kommt in der von Sugino et al.

untersuchten postprandialen Phase durch das Zusammenwirken vieler Neurotransmitter zu einer paradoxen Wirkung der eingesetzten Pharmaka. Zusammenfassend muss man aufgrund der derzeitigen Datenlage davon ausgehen, dass zumindest beim Menschen und der Ratte Acetylcholin eine stimulierende Wirkung auf die Freisetzung von Ghrelin besitzt.

Die Interpretation der im Rahmen dieser Arbeit am isolierten Rattenmagen gemessenen Werte gestaltet sich aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz schwierig und ist daher besonders kritisch zu bewerten. Tendenziell zeigt sich jedoch in der Gruppe der mit 2Hz stimulierten Nn. vagi, einer vornehmlich das cholinerge System ansprechenden Frequenz, eine dauerhafte Verringerung der Ghrelinsekretion. Die Aussagekraft wird durch den initial schwachen Anstieg der Ghrelinstimulation bei Vagusaktivierung schon vor der Infusion von Atropin jedoch in Frage gestellt. Auf der anderen Seite könnte auch gerade der geringe Anstieg für die fehlende statistische Signifikanz verantwortlich sein. Der Effekt von Atropin bei der Stimulation mit 10Hz, einer eher auf die peptiderge Transmission abzielenden Frequenz, ist geringer ausgeprägt und auch die sich in der 2Hz-Gruppe zeigende Persistenz des Effektes ist nicht gleichermaßen deutlich ersichtlich. Trotz fehlender Signifikanz liefern die geschilderten Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass das Verhalten des isolierten Rattenmagens mit den Ergebnissen anderer Publikationen vereinbar sein könnte (30,31,240) und ebenfalls einen inhibitorischen Effekt von Atropin auf die vagal induzierte Ghrelinsekretion zeigen könnte.

5.3. Gastrin

Gastrin wird postprandial von den G-Zellen des Magens vermehrt ausgeschüttet. Dabei kommt es zum einen durch Proteine zu einer nahrungsmittelspezifischen Freisetzung und zum anderen zu einer unspezifischen Ausschüttung durch die physikalische Magendehnung (57,172,191,246). Insbesondere im Hinblick auf die bereits beschriebenen Beobachtung, dass die Zusammensetzung der Nahrung einen Einfluss auf den Plasmaghrelinspiegel hat, könnte Gastrin also für die Ghrelinsekretion eine wichtige Rolle zukommen. Die Ergebnisse einiger *in vivo* Studien sind teilweise gegensätzlich: Bei wiederholter subkutaner Injektion hoher Dosen von Gastrin zeigt sich ein

stimulatorischer Effekt (128), während eine kontinuierliche zweitägige intraperitoneale Infusion keine Wirkung auf den Ghrelinspiegel von Ratten hat (150). Auch die kurzzeitiger intraperitoneale Infusion zeigt keine Änderung im Vergleich zu einer nüchternen Kontrollpopulation (148). Diese *in vivo* Ergebnisse stehen nicht zwangsläufig im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit veröffentlichten Daten, da im *in vivo* Modell andere Wirkungen von Gastrin, wie beispielsweise die Magensäureproduktion oder die Freisetzung von Somatostatin mögliche Störfaktoren darstellen könnten. Jedoch lässt der inhibitorische Effekt von Gastrin eine essentielle Rolle bei der stimulierenden Wirkung proteinreicher Nahrung auf den Ghrelinspiegel eher unwahrscheinlich erscheinen.

5.4. Somatostatin

Neben Ghrelin und Gastrin wird im Magen postprandial auch Somatostatin freigesetzt (172,191). Bei exogener Applikation bewirkt Somatostatin die Inhibition nahezu aller gastrointestinalen Funktionen und endogen sezerniertes Somatostatin verhindert überschießende Aktivierungen diverser exokriner und endokriner Sekretionsprozesse im Magen-Darm-Trakt (189). Die Expression und Sekretion von Somatostatin selbst steht unter dem stimulierenden Einfluss von Ghrelin, so dass ein negativer Rückkopplungsprozess wahrscheinlich ist (4). Der gemessene inhibitorische Effekt von Somatostatin auf die vagal induzierte Ghrelinfreisetzung steht somit im Einklang mit dem aktuellen Konzept der Physiologie von Somatostatin. Fernerhin sind die Ergebnisse gut vereinbar mit anderen Studien zum Einfluss von Somatostatin oder synthetischen Analoga auf die Ghrelinsekretion (13,32,159,198).

5.5. Glucagon-like Peptide-1

Nahrungsaufnahme führt nicht nur zur Ausschüttung von Magenhoromonen, sondern auch zur vermehrten Sekretion intestinaler Hormone, denen eine wichtige Rolle bei der Steuerung von gastrointestinalen und pankreatischen Funktionen, sowie der Magen-Darm-Motilität zukommen. Eines der wesentlichen Peptide, die dabei vom Dünndarm

sezerniert werden ist Glucagon-like Peptide-1(7-36)amid (GLP-1). Die Sekretion von GLP-1 wird durch Kohlenhydrataufnahme stimuliert, was wiederum zu einer Zunahme der durch Glucose induzierten Insulinfreisetzung führt (71,76). In den vorliegenden Experimenten zeigt sich für GLP-1 ein signifikant inhibitorischer Effekt (siehe Kapitel 3.2.3). Im Hinblick auf die bereits beschriebenen supprimierenden Effekt oral aufgenommener Glucose auf den Ghrelinspiegel (197), könnte GLP-1 an der Vermittlung dieses Phänomens durchaus einen maßgeblichen Anteil haben. Diese These wird durch die Ergebnisse von Caixas und Mitarbeitern gestützt, die bei menschlichen Probanden durch parenterale Glukoseinfusion den physiologischen postprandialen Blutzuckerspiegel imitierten und dabei keinen Einfluss auf die Ghrelinsekretion sehen konnten (37), so dass der Glukosespiegel alleine die Ghrelinsuppression nicht erklären kann. Daher scheint in der Zusammenschau der Ergebnisse der durch Glukose vermittelte Effekt auf Ghrelin tatsächlich weniger von systemischen Mechanismen, als vielmehr von intestinalen, maßgeblich wohl GLP-1, und abhängig zu sein. Die inhibitorische Wirkung von GLP-1 auf die Ghrelinfreisetzung könnte ihrerseits im Hinblick auf die im Rahmen dieser Arbeit demonstrierte inhibitorische Wirkung von Somatostatin (siehe Kapitel 3.2.2), auf der zumindest teilweisen Vermittlung durch Somatostatin beruhen. Zur Klärung dieser Fragestellung wären weitere Experimente unter gleichzeitiger Verabreichung eines Somatostatinantagonisten wünschenswert. Im Gegensatz zu den Untersuchungen zur Wirkung von Insulin zeigte sich bei GLP-1 eine Wirksamkeit erst in unphysiologisch hohen Dosen. Diese Tatsache schließt eine physiologische Relevanz jedoch nicht aus, da das verwendete *in vitro* Modell auch für andere Peptide wie beispielsweise Somatostatin oder Bombesin-related Peptides eine niedrigere Sensitivität besitzt.

Ein weiteres, in diesem Zusammenhang möglicherweise interessantes Darmhormon stellt Gastric inhibitory Polypeptide (GIP) dar. GIP wird postprandial von den K-Zellen des Duodenums und des proximalen Jejunums ausgeschüttet. Es wird wie GLP-1 ebenfalls durch die orale Aufnahme von Glukose stimuliert (43,168), führt zu erhöhter durch Glukose induzierter Insulinfreisetzung (72) und stimuliert die Somatostatinausschüttung (141). Es wird die Aufgabe weiterer Studien sein, die Relevanz von GIP für die Ghrelinsekretion zu klären.

5.6. Insulin

Für Insulin liegen einige *in vivo* – Studien bei Nagetieren und menschlichen Probanden vor, die auf einen inhibitorischen Effekt von Insulin auf die Ghrelinfreisetzung hinweisen (77,139,144,184,197). Erste Hinweise gaben die Experimente der Arbeitsgruppe von Shija und Mitarbeitern, die sowohl durch orale, wie auch intravenöse Verabreichung bei freiwilligen Versuchspersonen eine Senkung des Plasmaghrelinspiegels beobachteten (197). Fernerhin wird diese Hypothese durch weitere Experimente gestützt, die bei Infusion von hohen (139) bis supraphysiologischen Konzentrationen an Insulin (133), aber auch bei nahezu physiologischen Mengen einen Abfall des Ghrelinspiegels zeigen (77,144,184). Die Glukosekonzentration im Plasma hingegen scheint offensichtlich eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die durch Insulin provozierte Inhibition der Ghrelinsekretion sowohl bei Euglykämie wie auch bei Hypo- und Hyperglykämie nachweisbar ist (139,197). Dennoch bleibt die Wirkung von Insulin auf die Ghrelinfreisetzung umstritten, vor allem aufgrund der Untersuchungsergebnisse zweier Arbeitsgruppen, die postprandiale Veränderungen von Insulin- und Glukosespiegeln durch Infusion imitierten: Schaller und Mitarbeiter konnten einen Abfall des Ghrelinspiegels nur bei supraphysiologischen Dosen beobachten, während kleinere Mengen an Insulin sich als wirkungslos erwiesen (187). Auch die von Caixas und Mitarbeitern publizierten Ergebnisse zeigen keinen physiologischen Effekt.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen eine deutliche Verminderung der Ghrelinsekretion durch Insulin bei Normoglykämie und unter Ausblendung systemischer Effekte durch das isolierten Organmodell. Dieser Effekt ist über einen großen Konzentrationsbereich mit Signifikanz nachweisbar. Dabei entspricht die niedrigste Konzentration, die Wirkung zeigte etwa dem natürlicherweise vorkommenden postprandialen Konzentrationsanstieg von Insulin im Blutplasma, wobei jedoch, wie bereits erwähnt, der direkte Vergleich von *in vivo*- und *in vitro*- Daten sehr kritisch gesehen werden muss. Im molaren Vergleich erwies sich bei Insulin bereits bei niedrigeren Konzentrationen als wirksam, als dies bei den anderen untersuchten Hormonen der Fall war. Dies stützt die Vermutung, dass Insulin möglicherweise eine tragende Bedeutung für den Abfall der Plasmaghrelinkonzentration als Folge kohlenhydratreicher Nahrungsaufnahme spielen könnte. Darüber hinaus könnten die

bei Übergewichtigen dauerhaft erhöhten Insulinspiegel zumindest teilweise für die bei diesen Patienten verminderten basalen Ghrelinspiegel (53,229) verantwortlich sein.

5.7. Neuromedin C

Neuromedin C ist ein aus zehn Aminosäuren bestehendes Peptid aus der Gruppe der Bombesin-ähnlichen Peptide. Vertreter dieser Gruppe sind im Körper weit verbreitet: sie konnten im Zentralnervensystem, dem Pankreas, der Lunge und v.a. im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Dort wurden die höchsten Konzentrationen im Magen und im Kolon gemessen (35). Die zentralnervöse Injektion von Bombesin führt zur Senkung der Körperkerntemperatur (33,175), zu Sättigung und verminderter Nahrungsaufnahme (241,244). Diese physiologischen Effekte zeigen eine Gegensätzlichkeit zur Wirkung von Ghrelin, so dass die Einbeziehung an der Vermittlung des Bombesineffektes durch Ghrelin im Sinne einer Inhibition denkbar wäre.

Da Bombesin bei Säugetieren physiologischerweise nicht vorkommt, wurde für die Experimente im Rahmen dieser Studie auf Neuromedin C, einen natürlicherweise vorkommenden Vertreter der Bombesin-ähnlichen Peptide zurückgegriffen.

Die Ergebnisse zeigten dabei weder in der Konzentration von $10^{-8}M$, noch von $10^{-6}M$ einen signifikanten Einfluss auf die Ghrelinsekretion, so dass davon auszugehen ist, dass Neuromedin C *in vitro* keinen stimulierenden Effekt besitzt. Ein möglicher inhibitorischer Effekt sollte in Analogie zum Verfahren mit den anderen hier untersuchten gastrointestinalen Hormonen unter vagaler Vorstimulation untersucht werden. Bombesine führen bekanntermaßen unter anderem zu erhöhter Freisetzung von Insulin und Gastrin (140,244). Für diese beiden Hormone wurde, wie auch im Rahmen dieser Arbeit, ein inhibitorischer Effekt auf die Freisetzung von Ghrelin beschrieben, so dass *in vivo* eine teilweise auch über diese Hormone indirekt vermittelte Inhibition aus theoretischer Sicht durchaus denkbar wäre. In der internationalen Literatur finden sich derzeit keine anderen Studien zu einer möglichen Interaktion von Ghrelin und Peptiden der Bombesingruppe.

6. Zusammenfassung

Ghrelin ist ein aus 28 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon, das vor allem im Magen gebildet und sezerniert wird (120). Es stellt ein peripheres humorales Hungersignal dar und ist an der Regulation des Körpergewichts beteiligt. Neben der Stimulation der Wachstumshormonsekretion weist es auch zahlreiche andere Wirkungen auf unterschiedliche Organe auf. Im Gegensatz zur Erforschung der Wirkungen liegen kaum Ergebnisse zur Regulation der Ghrelinsekretion selbst vor. Bekannt ist, dass beim Menschen kohlenhydratreiche Nahrung zum Abfall und proteinreiche Nahrung zum Anstieg der Ghrelinspiegel führen (50,197,226,228). Die alleinige Dehnung des Magens hingegen zeigt keine Wirkung (75,197,226). Die für diese bemerkenswerten nährstoffabhängigen Phänomene verantwortlichen Regulationsmechanismen sind bislang unbekannt, deuten auf eine komplexe neuroendokrine Steuerung hin. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit der regulative Einfluss verschiedener Neuropeptide und Hormone, die physiologischerweise während der Nahrungsaufnahme sezerniert werden, auf die Ghrelinsekretion am isolierten Rattenmagen *in vitro* untersucht.

Die elektrische Stimulation des Nervus vagus mit einer Rechteckspannung von 10 Volt und 1ms Impulsdauer führte zu einer signifikant erhöhten Sekretion, die weitgehend unabhängig von pH-Wert (pH2 und pH7) und applizierter Frequenz war (2Hz, 5Hz, 10Hz, 20Hz).

Der Versuch, die durch elektrische Stimulation gesteigerte Ghrelinsekretion durch den Acetylcholinrezeptorantagonisten Atropin zu inhibieren, erbrachte keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Es zeigte jedoch sich tendenziell eine Inhibition, was im Einklang zu den Ergebnissen anderer publizierten Studien steht.

Die Wirkung verschiedener gastrointestinaler Hormone wurde unter vagaler Prästimulation untersucht, um bei niedrigen basalen Ghrelinspiegeln einen möglichen inhibitorischen Effekt messen zu können:

Gastrin-17 zeigte bei einer Konzentration 10^{-8} M eine signifikante Verringerung der Ghrelinausschüttung, wohingegen bei weiterer Verdünnung auf 10^{-10} M kein Effekt mehr erkennbar war. Der inhibitorische Effekt von Gastrin lässt eine essentielle Rolle bei der stimulierenden Kurzzeitwirkung proteinreicher Nahrung auf den Ghrelinspiegel eher unwahrscheinlich erscheinen.

Somatostatin führte zu verminderter Freisetzung von Ghrelin. Dies steht im Einklang mit anderen Studien und dem aktuellen Konzept der Physiologie von Somatostatin. Eine Rückkopplungsschleife zwischen Ghrelin und Somatostatin scheint wahrscheinlich.

Das Dünndarmhormon Glucagon-like-Peptide-1(7-36), das vor allem bei kohlenhydratreichen Mahlzeiten sezerniert wird, zeigte in den Konzentrationen 10^{-10} M und 10^{-9} M einen geringen, jedoch nicht signifikanten inhibitorischen Effekt. Hingegen war der inhibitorische Effekt in den höheren Konzentrationen von 10^{-8} M und 10^{-9} M signifikant. Die Wirkung nur in unphysiologisch hohen Dosen schließen eine physiologische Relevanz jedoch nicht aus, da das verwendete *in vitro* Modell auch für andere Peptide, wie beispielsweise Somatostatin oder Bombesin-related Peptides eine niedrigere Sensitivität besitzt. Somit könnte GLP-1 insbesondere bei dem durch Glukose und kohlenhydratreiche Nahrung induzierten Abfall des Ghrelinspiegels beteiligt sein.

Bei der Infusion von Insulin zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der vagal vorstimulierten Ghrelinsekretion über einen großen Konzentrationsbereich bei Normoglykämie. Lediglich in der Gruppe, die mit der geringsten Konzentration von 10^{-12} M perfundiert wurde, zeigte sich kein signifikanter Rückgang der Ghrelinsekretion. Im molaren Vergleich erwies sich Insulin bereits bei niedrigeren Konzentrationen als wirksam, als dies bei den anderen untersuchten Hormonen der Fall war. Dies stützt die Vermutung, dass Insulin möglicherweise für den Abfall der Plasmaghrelinkonzentration als Folge kohlenhydratreicher Nahrungsaufnahme von Bedeutung sein könnte.

Neuromedin C zeigte weder in der Konzentration von 10^{-8} molar, noch bei 10^{-6} molar einen signifikanten Einfluss auf die Ghrelinsekretion, so dass davon auszugehen ist, dass Neuromedin C *in vitro* keinen stimulierenden Effekt besitzt.

Zusammenfassend zeigen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten, dass Gastrin, Somatostatin, GLP-1(7-36) und Insulin die Ghrelinsekretion am isolierten Rattenmagen hemmen. Diese vier Hormone könnten damit möglicherweise an der Vermittlung der *in vivo* beobachteten postprandialen Inhibition der Ghrelinsekretion beteiligt sein. Vagale Aktivierung wirkt stimulierend und könnte damit der postprandialen Inhibition der Ghrelinsekretion entgegen wirken.

7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

- Abbildung 1: Versuchsschema zur elektrischen Vagusstimulation mit 5 Hz und 20 Hz für jeweils zehn Minuten. Während des gesamten Versuches wurde vaskulär mit Krebs-Ringer-Puffer und luminal mit einer auf pH2 oder pH7 titrierten isotonen Natriumchloridlösung perfundiert. Zwischen den Stimulationsphasen lag ein stimulationsfreies Intervall von 15 Minuten, vor der ersten Stimulation wurde ebenfalls für 25 Minuten nicht stimuliert, davon wurden zehn Minuten als „Vorlauf“ im Fraktionssammler aufgefangen. Nach der zweiten Stimulationsphase wurde für weitere zehn Minuten das Perfusat als „Nachlauf“ gesammelt. 13
- Abbildung 2: Versuchsschema zur elektrischen Vagusstimulation mit 2 Hz und 10 Hz für jeweils zehn Minuten. Während des gesamten Versuches wurde vaskulär mit Krebs-Ringer-Puffer und luminal mit einer auf pH2 oder pH7 titrierten isotonen Natriumchloridlösung perfundiert. Zwischen den Stimulationsphasen lag ein stimulationsfreies Intervall von 15 Minuten, vor der ersten Stimulation wurde ebenfalls für 25 Minuten nicht stimuliert, davon wurden zehn Minuten als „Vorlauf“ im Fraktionssammler aufgefangen. Nach der zweiten Stimulationsphase wurde für weitere zehn Minuten das Perfusat als „Nachlauf“ gesammelt. 14
- Abbildung 3: Versuchsschema zur Vagusstimulation bei 2Hz und 10Hz über einen Zeitraum von 40 Minuten. Während des gesamten Versuches wurde vaskulär mit Krebs-Ringer-Puffer und luminal mit einer auf pH2 titrierten isotonen Natriumchloridlösung perfundiert. Dem Beginn der Elektrostimulation ging eine stimulationsfreie Phase von 25 Minuten voran, von der das Perfusat der letzten 10 Minuten als „Vorlauf“ gesammelt wurden. Ebenso wurden nach dem Ausschalten für weitere 10 Minuten Proben gesammelt (Nachlauf). 15
- Abbildung 4: Versuchsschema zur Vagusstimulation bei 2Hz und 10Hz unter gleichzeitigem Einfluss von Atropin in einer Konzentration von 10^{-6} M. Während des gesamten Versuches wurde vaskulär mit Krebs-Ringer-Puffer und luminal mit einer auf pH 2 titrierten isotonen Natriumchloridlösung perfundiert. Atropin wurde in einer Konzentration von 10^{-6} M in Krebs-Ringer-Puffer gelöst und über 20 Minuten der insgesamt 40minütigen Elektrostimulation perfundiert. Dem Beginn der Elektrostimulation ging eine stimulationsfreie Phase von 25 Minuten voran, von der das Perfusat der

- letzten 10 Minuten als „Vorlauf“ gesammelt wurden. Ebenso wurden nach dem Ausschalten für weitere 10 Minuten Proben gesammelt (Nachlauf). 16
- Abbildung 5: Versuchsschema zur Austestung verschiedener gastrointestinaler Hormone unter elektrischer Prästimulation des N. vagus bei 10 Hz. Während des gesamten Versuches wurde vaskulär mit Krebs-Ringer-Puffer und luminal mit einer auf pH 2 titrierten isotonen Natriumchloridlösung perfundiert. Die zu untersuchende Substanz wurde in der entsprechenden Konzentration in Krebs-Ringer-Puffer gelöst und über 20 Minuten der insgesamt 40minütigen Elektrostimulation perfundiert. Dem Beginn der Elektrostimulation ging eine stimulationsfreie Phase von 25 Minuten voran, von der das Perfusat der letzten 10 Minuten als „Vorlauf“ gesammelt wurden. Ebenso wurden nach dem Ausschalten für weitere 10 Minuten Proben gesammelt (Nachlauf). 17
- Abbildung 7: Versuchsschema zum Stimulationsversuch mit Neuromedin C (NMC) für jeweils zehn Minuten in Konzentrationen von 10^{-8} M und 10^{-6} M. Während des gesamten Versuches wurde vaskulär mit Krebs-Ringer-Puffer, je nach Phase mit oder ohne gelöstes NMC, und luminal mit einer auf pH2 titrierten isotonen Natriumchloridlösung perfundiert. Zwischen den Stimulationsphasen lag ein stimulationsfreies Intervall von 15 Minuten, vor der ersten Stimulation wurde ebenfalls für 25 Minuten nicht stimuliert, davon wurden zehn Minuten als „Vorlauf“ im Fraktionssammler aufgefangen. Nach der zweiten Stimulationsphase wurde für weitere zehn Minuten das Perfusat als „Nachlauf“ gesammelt. 18
- Abbildung 8: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse der Vagusstimulation mit einer Frequenz von 2 Hz und 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=8). 21
- Abbildung 9: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse der Vagusstimulation mit einer Frequenz von 5 Hz und 20 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=7). 21
- Abbildung 10: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse der Vagusstimulation mit einer Frequenz von 2 Hz und 10 Hz bei neutralen intragastralen pH-Wert. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=7). 22
- Abbildung 11: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse der Vagusstimulation mit einer Frequenz von 2 Hz und 10 Hz bei neutralen intragastralen pH-Wert. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=7). 22

- Abbildung 12: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse der Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=8)..... 23
- Abbildung 13: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse der Vagusstimulation mit einer Frequenz von 2Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=8)..... 24
- Abbildung 14: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse bei Infusion von Atropin in einer Konzentration von 10^{-6} M während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=8). 25
- Abbildung 15: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse bei Infusion von Atropin in einer Konzentration von 10^{-6} M während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 2Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=8). 25
- Abbildung 16: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse bei Infusion von Gastrin in einer Konzentration von 10^{-8} M während einer Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=7)..... 26
- Abbildung 17: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse bei Infusion von Gastrin in einer Konzentration von 10^{-10} M während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=6). 27
- Abbildung 18: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse bei Infusion von Somatostatin in einer Konzentration von 10^{-6} M während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=7). 28
- Abbildung 19: Graphische Darstellung der Veränderung der Ghrelinsekretion bei Infusion von Glucagon-like-peptide-1(7-36)amid in einer Konzentration von 10^{-10} M (n=6), 10^{-9} M (n=7), 10^{-8} M (n=6) und 10^{-7} M (n=5) während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem

intrastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen. Signifikante Werte sind mit * gekennzeichnet.....	29
Abbildung 20: Graphische Darstellung der Veränderung der Ghrelinsekretion bei Infusion von Atropin in einer Konzentration von 10^{-12} M (n=6), 10^{-10} M (n=6), 10^{-8} M (n=5) und 10^{-6} M (n=5) während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intrastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen. Signifikante Werte sind mit * gekennzeichnet... 30	
Abbildung 21: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse bei Infusion von Neuromedin C in einer Konzentration von 10^{-8} M und 10^{-6} M ohne vagale Prästimulation bei einem intrastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 40 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse angetragen (n=7).....	31
Abbildung 22: Strukturformel von Ghrelin.....	33
Abbildung 23: Ghrelin-Aminosäuresequenz von Mensch (oben) und Ratte (unten). S* steht für n-oktanoyl-Serin. Schattiert dargestellt sind die nicht übereinstimmenden Aminosäuren in Position 11 und 12, die beim Menschen mit Arginin und Valin und bei der Ratte mit Lysin und Alanin besetzt sind.	34
Tabelle 1: Herkunftsverzeichnis der verwendeten Substanzen.....	12
Tabelle 2: Übersicht über beim Menschen nachweisbare Ghrelinderivate.....	35

8. Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
	Durchmesser
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AgRP	Agouti-related-Protein
Ala	Alanin
Arg	Arginin
AVP	Arginin ⁸ -Vasopressin
BMI	Body-Mass-Index
C	Celsius
ca.	Circa
CART	Cocaine- and amphetamine-regulated transcript
CCK	Cholezystokinin
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
DNS	Desoxiribonukleinsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
f	Femto-
g	Gramm
GABA	-Aminobuttersäure

GH	Growth Hormone
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormone
GHS	Growth Hormone Secretagogue
GHS-R	Growth Hormone Secretagogue – Receptor
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GIP	Gastric inhibitory polypeptide
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
His	Histidin
Hz	Hertz
i.c.v.	intracerebroventrikulär
I.E.	Internationale Einheit
IGF-I	Insulin-like-growth-factor I
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
LepR	Leptinrezeptor
Lig.	Ligamentum
Ligg.	Ligamenta
M	molar
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MCH	Melanin-concentrating-Hormone
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mol	Mol
Ms	Millisekunde

mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure
N.	Nervus
Nn.	Nervi
NMC	Neuromedin C
NPY	Neuropeptid Y
o.g.	oben genannte(r)
Phe	Phenylalanin
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Hydroxyl-Kinase
PIT-1	Pituitary-specific transcription factor-1
PKC	Proteinkinase C
POMC	Proopiomelanocortin
Pro	Prolin
REM	Rapid-eye-movement
RIA	Radioimmunoassay
s	Sekunde
S.	Seite
SEM	Standard error of the mean (Standardabweichung des Mittelwertes)
Ser	Serin
SRIF	Somatotropin Release Inhibiting Factor (Somatostatin)
Tab.	Tabelle
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormon
V.	Vena
Vv.	Venae
ZNS	Zentralnervensystem
z.B.	zum Beispiel

9. Literaturverzeichnis

- (1) Adeghate E; Ponery AS. Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *J Neuroendocrinol* 2002;**14**(7):555-60.
- (2) Air,EL; Strowski,MZ; Benoit,SC; Benoit SC; Conarello SL; Zhang BB; Woods SC; Liu K; Guan XM und Salituro GM. Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity. *Nat.Med.* 2002;. **8**, 179-183.
- (3) Ariyasu H; Takaya K; Tagami T; Ogawa Y; Hosoda K; Akamizu T; Suda M; Koh T; Natsui K; Toyooka S; Shirakami G; Usui T; Shimatsu A; Doi K; Hosoda H; Kojima M; Kangawa K und Nakao K. 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**(10):4753-8.
- (4) Arosio M; Ronchi C; Gebbia C; Cappiello V; Beck-Peccoz P und Peracchi M. Stimulatory effects of ghrelin on circulating somatostatin and pancreatic polypeptide levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**:701-4.
- (5) Arvat E; Di Vito L; Broglio F; Papotti M; Muccioli G; Dieguez C; Casanueva FF; Deghenghi R; Camanni F und Ghigo E. Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *J Endocrinol Invest* 2000;**23**(8):493-5.
- (6) Arvat E; Maccagno B. und Ramunni J.. Effects of dexamethasone and alprazolam, a benzodiazepine, on the stimulatory effect of hexarelin, a synthetic GHRP, on ACTH, cortisol and GH secretion in humans. *Neuroendocrinology* 1998;**67**:310-6.
- (7) Arvat E; Maccario M; Di Vito L; Broglio F; Benso A; Gottero C; Papotti M; Muccioli G; Dieguez C; Casanueva FF; Deghenghi R; Camanni F und Ghigo E. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**(3):1169-74.
- (8) Asakawa A; Inui A; Kaga T; Katsuura G; Fujimiya M; Fujino K und Kasuga M. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 2003;**52**:947-52.
- (9) Asakawa A; Inui A; Kaga T; Yuzuriha H; Nagata T; Fujimiya M; Katsuura G; Makino S; Fujino MA und Kasuga M. A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice. *Neuroendocrinology* 2001;**74**(3):143-7.

-
- (10) Asakawa A; Inui A; Kaga T; Yuzuriha H; Nagata T; Ueno N; Makino S; Fujimiya M; Niiijima A; Fujino MA und Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001;**120**(2):337-45.
- (11) Bailey AR; Giles M; Brown CH; Bull PM; MacDonald LP; Smith LC; Smith RG; Leng G und Dickson SL. Chronic central infusion of growth hormone secretagogues: effects on fos expression and peptide gene expression in the rat arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 1999;**70**:83-92.
- (12) Baldanzi,G; Filigheddu,N; Cutrupi,S; Catapano,F; Bonisconi,S; Fubini,A; Malan,D; Baj,G; Granata,R; Broglio,F; Papotti,M; Surico,N; Bussolino,F; Isgaard,J; Deghenghi,R; Sinigaglia,F; Prat,M; Muccioli,G; Ghigo,E und Graziani,A. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 2002;. **159**(6), 1029-1037.
- (13) Barkan AL; Dimaraki E; Jessup S; Symons K; Ermolenko M und Jaffe CA. Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**:2180-4.
- (14) Barlier A; Zamora AJ und Grino M. Expression of functional growth hormone secretagogue receptors in human pituitary adenomas: polymerase chain reaction, triple in situ hybridization and cell culture studies. *J Neuroendocrinol* 1999;**11**:491-502.
- (15) Bellone S; Rapa A; Vivenza D; Castellino N; Petri A; Bellone J; Me E; Broglio F; Prodam F; Ghigo E und Bona G. Circulating ghrelin levels as function of gender, pubertal status and adiposity in childhood. *J Endocrinol Invest* 2002;**25**(5):RC13-RC15.
- (16) Bergmann K.E.; Mensink G.B.. Körpermaße und Übergewicht. 1999;61 . *Gesundheitswesen* 1999;**61**(Supplement):S115-S120.
- (17) Bisi G; Podio V; Valetto MR; Broglio F; Bertuccio G; Aimaretti G; Pelosi E; Del Rio G; Muccioli G; Ong H; Boghen MF; Deghenghi R und Ghigo E. Cardiac effects of hexarelin in hypopituitary adults. *Eur J Pharmacol* 1999;**381**:31-8.
- (18) Bisi G; Podio V; Valetto MR; Broglio F; Bertuccio G; Del Rio G; Arvat E; Boghen MF; Deghenghi R; Muccioli G; Ong H und Ghigo E. Acute cardiovascular and hormonal effect of GH and hexarelin, a synthetic GH-releasing peptide, in humans. *J Endocrinol Invest* 1999;**22**:266-72.
- (19) Bodart V; Bouchard C; McNicoll N; Escher E; Carriere P; Ghigo E; Sejlitz T; Sirois G; Lamontagne D und Ong H. Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ Res* 1999;**85**:796-808.
- (20) Bodner M; Castrillo JL; Theill LE; Deerinck T; Ellisman M und Karin M. The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox- containing protein. *Cell* 1988;**55**(3):505-18.
- (21) Bowers CY. On a peptidomimetic growth hormone-releasing peptide. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;**79**(4):940-2.
- (22) Bowers CY. Unnatural growth hormone-releasing peptide begets natural ghrelin. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**(4):1464-9.
- (23) Bowers,CY; Chang,J; Momany,F und Folkers,K. Effects of the enkephalins and enkephalin analogs on release of pituitary hormones in vitro. *Mol.Endocrinol.* 1977;. **1**, 287-292. Amsterdam, Elsevier.

-
- (24) Bowers,CY und et al. Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology* 1980;. **106**, 663-667.
- (25) Bray,G; Fisler,J und York,D. Neuroendocrine control of the development of obesity: understanding gained from studies of experimental animal models. *Front Neuroendocrinol* 1990;. **11**, 128-181.
- (26) Broglio F; Arvat E; Benso A; Gottero C; Muccioli G; Papotti M; Van Der Lely AJ; Deghenghi R und Ghigo E. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**(10):5083-6.
- (27) Broglio F; Arvat E; Benso A; Gottero C; Prodam F; Granata R; Papotti M; Muccioli G; Deghenghi R und Ghigo E. Ghrelin: much more than a natural growth hormone secretagogue. *Isr Med Assoc J* 2002;**4**(8):607-13.
- (28) Broglio F; Benso A; Valetto MR; Gottero C; Quaranta L; Podio V; Arvat E; Bobbio M; Bisi G und Ghigo E. Growth hormone-independent cardiotropic activities of growth hormone-releasing peptides in normal subjects, in patients with growth hormone deficiency, and in patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy. *Endocrine* 2001;**14**:105-8.
- (29) Broglio F; Gottero C; Arvat E und Ghigo E. Endocrine and on-Endocrine Actions of Ghrelin. *Horm Res* 2003;**59**:109-17.
- (30) Broglio F; Gottero C; Benso A; Prodam F; Casanueva FF; Dieguez C; Van Der Lely AJ; Deghenghi R; Arvat E und Ghigo E. Acetylcholine does not play a major role in mediating the endocrine responses to ghrelin, a natural ligand of the GH secretagogue receptor, in humans. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;**58**(1):92-8.
- (31) Broglio,F; Gottero,C; van Koetsveld,P; Prodam,F; Destefanis,S; Benso,A; Gauna,C; Hofland,LJ; Arvat,E; Van Der Lely,AJ und Ghigo,E. Acetylcholine Regulates Ghrelin Secretion in Humans. *J Clin.Endocrinol.Metab* 2004;. **89**(5), 2429-2433.
- (32) Broglio F; van Koetsveld P; Benso A; Gottero C; Prodam F; Papotti M; Muccioli G; Gauna C; Hofland LJ; Deghenghi R; Arvat E; Van Der Lely AJ und Ghigo E. Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**:4829-32.
- (33) Brown M; Rivier J und Vale W. Bombesin: potent effects on thermoregulation in rat. *Science* 1977;**196**:998.
- (34) Bruning,JC; Gautam,D; Burks,DJ; Gillette J.; Schubert M; Orban PC; Klein R; Krone W; Muller-Wieland D und Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 2000;. **289**, 2122-2125.
- (35) Buffa R; Solovieva I; Fiocca R; Giorgino S; Rindi G; Solcia E; Monchizuchi T; Yanaigara C und Yanaigara N. Localization of bombesin and GRP (gastrin releasing peptide) sequences in gut nerves or endocrine cells. *Histochemistry* 1982;**76**:457-67.
- (36) Buisson B; Bertrand D. Open-channel blockers at human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* 1998;**53**:555-63.
- (37) Caixas A; Bashore C; Nash W; Pi-Sunyer F und Laferrere B. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**(4):1902.

-
- (38) Camanni F; Ghigo E und Arvat E. Growth hormone-releasing peptides and their analogs. *Front Neuroendocrinol* 1998;**19**:47-72.
- (39) Campfield LA und Smith,F. Transient declines in blood glucose signal meal initiation. *Int.J.Obes.* 1990;. **14**((Suppl 3)), 15-33.
- (40) Casanueva,F und Dieguez,C. Ghrelin: The Link Connecting Growth with Metabolism and Energy Homeostasis. *Review in Endocrine & Metabolic Disorders* 2002;. **3**, 325-338.
- (41) Cassoni P; Papotti M; Catapano F; Deghenghi R; Ghigo E und Muccioli G. Specific binding sites for synthetic growth-hormone secretagogues in non-tumoral and neoplastic human thyroid tissue. *J Endocrinol* 2000;**165**:139-46.
- (42) Cassoni P; Papotti M; Ghe C; Catapano F; Sapino A; Graziani A; Deghenghi R; Reissmann T; Ghigo E und Muccioli G. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**(4):1738-45.
- (43) Cataland,S; Crockett,SE; Brown,JC und Mazzaferri,EL. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulation by oral glucose in man. *J Clin.Endocrinol.Metab* 1974;. **39**, 223-228.
- (44) Cheng K; Chan WW; Butler B; Barreto A, Jr. und Smith RG. Evidence for a role of protein kinase-C in His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys- NH₂-induced growth hormone release from rat primary pituitary cells. *Endocrinology* 1991;**129**(6):3337-42.
- (45) Chey,WY und Chang,T. Neural hormonal regulation of exocrine pancreatic secretion. *Pancreatology* 2001;. **1**, 320-335.
- (46) Ciccarelli E; Grottoli S und Razzore P. Hexarelin, a synthetic growth hormone releasing peptide, stimulates prolactin secretion in acromegalic but not in hyperprolactinemic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996;**44**:67-71.
- (47) Clement K; Vaisse C; Lahlou N; Cabrol S; Pelloux V; Cassuto D; Gormelen M; Dina C; Chambaz J; Lacorte JM; Basdevant A; Bougneres P; Lebouc Y; Froguel P und Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998;**392**(392):398-401.
- (48) Considine RV; Sinha MK; Heiman ML; Kriauciunas A; Stephens TW; Nyce MR; Ohannesian JP; Marco CC; McKee LJ; Bauer TL und et al.. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal weight and obese humans. *N.Engl.J Med.* 1996;. **334**, 292-295.
- (49) Corbetta S; Peracchi M; Cappiello V; Lania A; Lauri E; Vago L; Beck-Peccoz P und Spada A. Circulating Ghrelin Levels in Patients with Pancreatic and Gastrointestinal Neuroendocrine Tumors: Identification of One Pancreatic Ghrelinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**(7):3117-20.
- (50) Cummings DE; Purnell JQ; Frayo RS; Schmidova K; Wisse BE und Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001;**50**(8):1714-9.
- (51) Cummings,DE und Schwartz,MW. Genetics and Pathophysiology of human obesity. *Annu.Rev.Med.* 2003;. **54**, 453-471.

- (52) Cummings,DE und Shannon,MH. Roles for Ghrelin in the Regulation of Appetite and Body Weight. *Arch.Surg.* 2003;. **138**, 389-396.
- (53) Cummings DE; Weigle DS; Frayo RS; Breen PA; Ma MK; Dellinger EP und Purnell JQ. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2002;**346**(21):1623-30.
- (54) Date Y; Kojima M; Hosoda H; Sawaguchi A; Mondal MS; Suganuma T; Matsukura S; Kangawa K und 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**(11):4255-61.
- (55) Date Y; Murakami N; Kojima M; Kuroiwa T; Matsukura S; Kangawa K und Nakazato M. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;**275**(2):477-80.
- (56) Date Y; Murakami N; Toshinai K; Matsukura S; Nijijima A; Matsuo H; Kangawa K und Nakazato M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002;**123**(4):1120-8.
- (57) Date Y; Nakazato M; Hashiguchi S; Dezaki K; Mondal MS; Hosoda H; Kojima M; Kangawa K; Arima T; Matsuo H; Yada T und Matsukura S. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 2002;**51**(1):124-9.
- (58) Date Y; Nakazato M; Murakami N; Kojima M; Kangawa K und Matsukura S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;**280**(3):904-7.
- (59) Davis,JD; Gallagher,RF und Ladove,RF. Food intake controlled by blood factor. *Science* 1967;. **156**, 1247-1248.
- (60) De Gennaro Colonna V; Rossoni G; Bernareggi M; Muller E und Berti F. Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protection by hexarelin. *Eur J Pharmacol* 1997;**334**:201-7.
- (61) Deutsche Adipositas-Gesellschaft; Deutsche Diabetes-Gesellschaft und Deutsche Gesellschaft für Ernährung. Prävention und Therapie der Adipositas - Leitlinie der Fachgesellschaften. <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/050-001.htm> 29-11-2004;.
- (62) Dickson SL; Doutrelant-Viltart O; Dyball RE und Leng G. Retrogradely labelled neurosecretory neurones of the rat hypothalamic arcuate nucleus express Fos protein following systemic injection of GH-releasing peptide-6. *J Endocrinol* 1996;**151**:323-31.
- (63) Dickson SL; Doutrelant-Viltart O und Leng G. GH-deficient dw/dw rats and lit/lit mice show increased Fos expression in the hypothalamic arcuate nucleus following systemic injection of GH-releasing peptide-6. *J Endocrinol* 1995;**146**:519-26.
- (64) Dickson SL; Leng G; Dyball RE und Smith RG. Central actions of peptide and non-peptide growth hormone secretagogues in the rat. *Neuroendocrinology* 1995;**61**:36-43.
- (65) Dickson SL; Leng G und Robinson IC. Electrical stimulation of the rat periventricular nucleus influences the activity of hypothalamic arcuate neurones. *J Neuroendocrinol* 1993;**6**:359-67.

-
- (66) Dickson SL; Leng G und Robinson IC. Systemic administration of growth hormone-releasing peptide activates hypothalamic arcuate neurons. *Neuroscience* 1993;**53**(2):303-6.
- (67) Dickson SL; Luckman SM. Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. *Endocrinology* 1997;**138**:771-7.
- (68) Dickson SL; Viltart O; Bailey AR und Leng G. Attenuation of the growth hormone secretagogue induction of Fos protein in the rat arcuate nucleus by central somatostatin action. *Neuroendocrinology* 1997;**66**:188-94.
- (69) Dieguez C; Casanueva FF. Ghrelin: a step forward in the understanding of somatotroph cell function and growth regulation. *Eur J Endocrinol* 2000;**142**(5):413-7.
- (70) Dornonville dIC; Bjorkqvist M; Sandvik AK; Bakke I; Zhao CM; Chen D und Hakanson R. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept* 2001;**99**(2-3):141-50.
- (71) Drucker,DJ. Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. *Gastroenterology* 2002;. **122**, 531-544.
- (72) Dupre,J; Ross,SA; Watson,D und Brown,JC. Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J Clin.Endocrinol.Metab* 1973;. **37**, 826-828.
- (73) Egido EM; Rodriguez-Gallardo J; Silvestre RA und Marco J. Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *Eur J Endocrinol* 2002;**146**(2):241-4.
- (74) Elmquist,J. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *Int.J.Obes.* 2001;. **25**((Suppl.5)), S78-S82.
- (75) Erdmann,J; Lippl,F und Schusdziarra,V. Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regul.Pept.* 2003;. **116**, 101-107.
- (76) Fehmman HC; Goke R. und Goke B.. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocr.Rev.* 1995;. **16**, 390-410.
- (77) Flanagan,DE; Evans,ML; Monsod,TP; Rife,F; Heptulla,RA; Tamborlane,WV und et al.. The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 2003;. **284**, E313-E316.
- (78) Folwaczny C; Chang JK und Tschop M. Ghrelin and motilin: two sides of one coin? *Eur J Endocrinol* 2001;**144**(4):R1-R3.
- (79) Fox,FW. The enigma of obesity. *Lancet* 1973;. **2**, 1487-1488.
- (80) Foxcroft,DR und Milne,R. Orlistat for the treatment of obesity: rapid review and cost effectiveness model. *Obes.Rev.* 2000;. **1**, 121-126.
- (81) Friedman,JM. Obesity in the new millenium. *Nature* 2000;. **404**, 632-634.

-
- (82) Friedman, JM und Halaas, JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; **395**, 763-770.
- (83) Fujino K; Inui A; Asakawa A; Kihara N; Fujimura M und Fujimiya M. Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. *J Physiol* 2003; **550**(1):227-40.
- (84) Garcia A; Alvarez CV; Smith RG und Dieguez C. Regulation of Pit-1 expression by ghrelin and GHRP-6 through the GH secretagogue receptor. *Mol Endocrinol* 2001; **15**(9):1484-95.
- (85) Ghe C; Cassoni P; Catapano F; Marrocco T; Deghenghi R; Ghigo E; Muccioli G und Papotti M. The Antiproliferative Effect of Synthetic Peptidyl GH Secretagogues in Human CALU-1 Lung Carcinoma Cells. *Endocrinology* 2002; **143**(2):484-91.
- (86) Ghigo E; Arvat E; Giordano R; Broglio F; Gianotti L; Maccario M; Bisi G; Graziani A; Papotti M; Muccioli G; Deghenghi R und Camanni F. Biologic activities of growth hormone secretagogues in humans. *Endocrine* 2001; **14**(1):87-93.
- (87) Gilon, P und Henquin, JC. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic β -Cell function. *Endocr.Rev.* 2001; **22**, 565-604.
- (88) Gnanapavan S; Kola B; Bustin SA; Morris DG; McGee P; Fairclough P; Bhattacharya S; Carpenter R; Grossman AB und Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; **87**(6):2988.
- (89) Grill HJ und Kaplan JM. The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Front Neuroendocrinol* 2002; **23**, 2-40.
- (90) Grill HJ; Schwartz MW; Kaplan JM; Foxhall JS; Breininger J und Baskin DG. Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology* 2002; **143**, 239-246.
- (91) Gualillo O; Caminos J; Blanco M; Garcia-Caballero T; Kojima M; Kangawa K; Dieguez C und Casanueva F. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 2001; **142**(2):788-94.
- (92) Guillaume V; Magnan E; Cataldi M; Dutour A; Sauze N; Renard M; Razafindraibe H; Conte-Devolx B; Deghenghi R; Lenaerts V und .. Growth hormone (GH)-releasing hormone secretion is stimulated by a new GH-releasing hexapeptide in sheep. *Endocrinology* 1994; **135**(3):1073-6.
- (93) Haqq, AM; Farooqi, IS; O'Rahilly, S; Stadler, DD; Rosenfeld, RG; Pratt, KL; LaFranchi, SH und Prunell, JQ. Serum Ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. *J Clin. Endocrinol. Metab* 2003; **88**, 174-178.
- (94) Hattori N; Saito T; Yagyu T; Jiang BH; Kitagawa K und Inagaki C. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**(9):4284-91.
- (95) Hetherington AW; Ranson SW. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec* 1940; **78**:149-72.

-
- (96) Heymsfield S; Greenberg AS; Fujioka K; Dixon RM; Kushner R; Hunt T; Lubina JA; Patane J; Self B; Hunt P und McCamish M. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* 1999;**282**(16):1568-75.
- (97) Hickey GJ; Drisko J; Faidley T; Chang C; Anderson LL; Nicolich S; McGuire L; Rickes E; Krupa D; Feeney W; Friscino B; Cunningham P; Frazier E; Chen H; Laroque P und Smith RG. Mediation by the central nervous system is critical to the in vivo activity of the GH secretagogue L-692,585. *J Endocrinol* 1996;**1**(2):371-80.
- (98) Higgs RH; Smyth RD und Castell DO. Gastric alkalization: effect on lower esophageal-sphincter pressure and serum gastrin. *N Engl J Med* 1974;**291**:486-90.
- (99) Honda K; Bailey AR; Bull PM; MacDonald LP; Dickson SL und Leng G. An electrophysiological and morphological investigation of the projections of growth hormone-releasing peptide-6-responsive neurons in the rat arcuate nucleus to the median eminence and to the paraventricular nucleus. *Neuroscience* 1999;**90**:875-83.
- (100) Hoshino R; Chatani Y; Yamori T; Tusuro T; Oka H und Yoshida O. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumours. *Oncogene* 1999;**8**(3):813-22.
- (101) Hosoda H; Kojima M; Matsuo H und Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;**279**(3):909-13.
- (102) Hosoda H; Kojima M; Matsuo H und Kangawa K. Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem* 2000;**275**(29):21995-2000.
- (103) Hosoda H; Kojima M; Mizushima T; Shimizu S und Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin; identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem* 2002.
- (104) Howard,A; Feighner,S; Cully,D; Arena,J; Liberato,P; Rosenblum,C; Hamelin,M; Hreniuk,D; Palyha,O; Anderson,J; Paress,P; Diaz,C; Chou,M; Liu,K; McKee,K; Pong,S; Chung,L; Elbrecht,A; Dashkevich,M; Heavens,R; Rigby,M; Sirinathsinghji,D; Dean,D; Melillo,D; Patchett,AA; Nargund,RP; Griffin,P; De Martino,J; Gupta,S; Schaeffer,J; Smith,RG und Van der Ploeg,LH. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996;**273**, 974-977.
- (105) Husemann B.. Die chirurgische Therapie der extremen Adipositas. 1997;. *Dt Ärztebl* 1997;**94**:A2132-A2136.
- (106) Inui A. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat Rev Neurosci* 2001;**2**(8):551-60.
- (107) Inui A; Meguid MM. Ghrelin and cachexia. *Diabetes Obes Metab* 2002;**4**(6):431.
- (108) Iwakura H; Hosoda K; Doi R; Komoto I; Nishimura H; Son C; Fujikura J; Tomita T; Takaya K; Ogawa Y; Hayashi T; Inoue G; Akamizu T; Hosoda H; Kojima M; Kangawa K; Imamura M und Nakao K. Ghrelin expression in islet cell tumors: augmented expression of ghrelin in a case of

- glucagonoma with multiple endocrine neoplasm type I. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**(11):4885-8.
- (109) Jeffery PL; Herington AC und Chopin LK. Expression and action of the growth hormone releasing peptide ghrelin and its receptor in prostate cancer cell lines. *J Endocrinol* 2002;**172**(3):R7-11.
- (110) Jeffery PL; Herington AC und Chopin LK. The potential autocrine/paracrine roles of ghrelin and its receptor in hormone-dependent cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2003;**14**:113-22.
- (111) Junqueira, Carneiro. Histologie. 4. ed. Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Budapest; Hongkong; London; Mailand; Paris; Santa Clara; Singapur; Tokio: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1996.
- (112) Kaji H; Kishimoto M; Kirimura T; Iguchi G; Murata M; Yoshioka S; Iida K; Okimura Y; Yoshimoto Y und Chihara K. Hormonal regulation of the human ghrelin receptor gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;**284**(3):660-6.
- (113) Kamegai J; Tamura H; Shimizu T; Ishii S; Sugihara H und Oikawa S. Regulation of the ghrelin gene: growth hormone-releasing hormone upregulates ghrelin mRNA in the pituitary. *Endocrinology* 2001;**142**(9):4154-7.
- (114) Kanamoto N; Akamizu T; Hosoda H; Hataya Y; Ariyasu H; Takaya K; Hosoda K; Saijo M; Moriyama K; Shimatsu A; Kojima M; Kangawa K und Nakao K. Substantial production of ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**(10):4984-90.
- (115) Katugampola SD; Kuc RE; Maguire JJ und Davenport AP. G-protein-coupled receptors in human atherosclerosis: comparison of vasoconstrictors (endothelin and thromboxane) with recently de-orphanized (urotensin-II, apelin and ghrelin) receptors. *Clin Sci (Lond)* 2002;**103 Suppl 48**:171S-5S.
- (116) Katugampola SD; Maguire JJ; Kuc RE; Wiley KE und Davenport AP. Discovery of recently adopted orphan receptors for apelin, urotensin II, and ghrelin identified using novel radioligands and functional role in the human cardiovascular system. *Can J Physiol Pharmacol* 2002;**80**(5):369-74.
- (117) Katugampola SD; Pallikaros Z und Davenport AP. [125I-His(9)]-ghrelin, a novel radioligand for localizing GHS orphan receptors in human and rat tissue: up-regulation of receptors with atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 2001;**134**(1):143-9.
- (118) King MK; Gay DM; Pan LC; McElmurray JH; Hendrick JW; Pirie C; Morrison A; Ding C; Mukherjee R und Spinale FG. Treatment with a growth hormone secretagogue in a model of developing heart failure. Effects on ventricular and myocyte function. *Circulation* 2001;**103**:308-12.
- (119) Kinoshita,H; Ijiri,S; Ameno,T; Kubita,X; Zhang,S; Hisida,S und Ameno,K. Cholinergic nerves mediate acetaldehyde action in the gastrointestinal tract. *Alcohol Alcoholism* 2001; **36**, 377-380.
- (120) Kojima M; Hosoda H; Date Y; Nakazato M; Matsuo H und Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;**402**(6762):656-60.
- (121) Kojima M; Hosoda H und Kangawa K. Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Horm Res* 2001;**56 Suppl 1**:93-7.

-
- (122) Kojima M; Hosoda H; Matsuo H und Kangawa K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2001;**12**(3):118-22.
- (123) Koopmans,HS. A stomach hormone that inhibits food intake. *J.Auton.Nerv.Syst.* 1983;. **9**, 157-171.
- (124) Korbonits M; Bustin SA; Kojima M; Jordan S; Adams EF; Lowe DG; Kangawa K und Grossman AB. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**(2):881-7.
- (125) Korbonits M; Kaltas G und Perry L.. The growth-hormone secretagogue hexarelin stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis via arginine-vasopressin. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**:2489-95.
- (126) Korbonits M; Kojima M; Kangawa K und Grossman AB. Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine* 2001;**14**(1):101-4.
- (127) Korbonits M; Little JA; Forsling ML; Tringali G; Costa A; Navarra P; Trainer PJ und Grossman AB. The effect of growth hormone secretagogues and neuropeptide Y on hypothalamic hormone release from acute rat hypothalamic explants. *J Neuroendocrinol* 1999;**11**(7):521-8.
- (128) Lee HM; Wang G; Englander EW; Kojima M und Greeley GH, Jr.. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 2002;**143**(1):185-90.
- (129) Leibel,RL; Rosenbaum,M und Hirsch,J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N.Engl.J Med.* 1995;. **332**, 621-628.
- (130) Lissett CA; Shalet SM. Effects of growth hormone on bone and muscle. *Growth Horm IGF Res* 2000;**10**:S95-S101.
- (131) Locke,W; Kirgis,HD; Bowers,CY und Abdoh,AA. Intracerebroventricular growth-hormone-releasing peptide-6 stimulates eating without affecting plasma growth hormone response in rats. *Life Sci.* 1995;. **56**, 1347-1352.
- (132) Lu S; Guan JL; Wang QP; Uehara K; Yamada S; Goto N; Date Y; Nakazato M; Kojima M; Kangawa K und Shioda S. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 2002;**321**(3):157-60.
- (133) Lucidi,P; Murdolo,G; Di Loreto,C; De Cicco,A; Parlanti,N; Fanelli,C und et al.. Ghrelin is not necessary for adequate hormonal counterregulation of insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes* 2002;. **50**, 707-709.
- (134) Luckman SM; Rosenzweig I und Dickson SL. Activation of arcuate nucleus neurons by systemic administration of leptin and growth hormone-releasing peptide-6 in normal and fasted rats. *Neuroendocrinology* 1999;**70**:93-100.
- (135) Maclaren R; Shields CA. Respiratory failure following oral administration of metocloperamide. *Ann Pharmacother* 2000;**32**:1017-20.

- (136) Maheshwari HG; Rahim A; Shalet SM und Baumann G. Selective lack of growth hormone (GH) response to the GH-releasing peptide hexarelin in patients with GH-releasing hormone receptor deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**(3):956-9.
- (137) Manson,JE; Colditz,GA; Stampfer,MJ; Willett,WC; Rosner,B; Manson,RR; Speizer,FE und Hennekens,CH. A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in women. *N.Engl.J Med.* 1990;. **322**(13), 882-889.
- (138) Masuda Y; Tanaka T; Inomata N; Ohnuma N; Tanaka S; Itoh Z; Hosoda H; Kojima M und Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;**276**(3):905-8.
- (139) McCowen,KC; Maykel,JA; Bistrain,BR und Ling,PR. Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *J Endocrinol.* 2002;. **175**, R7-R11.
- (140) McDonald T; Ghatei MA; Bloom SR; Track NS; Radziuk J und Dupre J. A quantitative comparison of canine plasma gastroenteropancreatic hormone response to bombesin and the porcine gastrin releasing peptide (GRP). *Regul Pept* 1981;**2**:293-304.
- (141) McIntosh,CH; Pederson,RA; Koop,H und 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**, 468-472.
- (142) McKee KK; Palyha OC; Feighner SD; Hreniuk DL; Tan CP; Phillips MS; Smith RG; Van der Ploeg LH und Howard AD. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol* 1997;**11**(4):415-23.
- (143) Mehnert H, Schöffling K, Standl E *et al.* Diabetologie in Klinik und Praxis. 3.Auflage ed. Stuttgart, NewYork: Georg Thieme Verlag, 1994.
- (144) Mohlig,M; Spranger,J; Otto,B; Ristow,M; Tschop,M und Pfeiffer,AF. Euglycemic hyperinsulinemia, but not lipid infusion decreases circulating ghrelin levels in humans. *J Endocrinol.Invest* 2002;. **25**, RC36-RC38.
- (145) Montague CT; Farooqi IS; Whitehead JP; Soos MA; Rau H; Wareham NJ; Sewter CP; Digby JE; Mohammed SN; Hurst JA; Cheetham CH; Earley AR; Barnett AH; Prins JB und O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997;**387**(6636):903-8.
- (146) Mori K; Yoshimoto A; Takaya K; Hosoda K; Ariyasu H; Yahata K; Mukoyama M; Sugawara A; Hosoda H; Kojima M; Kangawa K und Nakao K. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett* 2000;**486**(3):213-6.
- (147) Muccioli G; Tschop M; Papotti M; Deghenghi R; Heiman M und Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol* 2002;**440**(2-3):235-54.
- (148) Murakami N; Hayashida T; Kuroiwa T; Nakahara K; Ida T; Mondal MS; Nakazato M; Kojima M und Kangawa K. Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. *J Endocrinol* 2002;**174**(2):283-8.

- (149) Murata M; Okimura Y; Iida K; Matsumoto M; Sowa H; Kaji H; Kojima M; Kangawa K und Chihara K. Ghrelin Modulates the Downstream Molecules of Insulin Signaling in Hepatoma Cells. *J Biol Chem* 2002;**277**(7):5667-74.
- (150) Mustonen AM; Nieminen P und Hyvarinen H. Preliminary evidence that pharmacologic melatonin treatment decreases rat ghrelin levels. *Endocrine* 2001;**16**(1):43-6.
- (151) N.Finer. Pharmacotherapy of obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002;**16**:717-42.
- (152) Nagaya N; Kojima M; Uematsu M; Yamagishi M; Hosoda H; Oya H; Hayashi Y und Kangawa K. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;**280**(5):R1483-R1487.
- (153) Nagaya N; Miyatake K; Uematsu M; Oya H; Shimizu W; Hosoda H; Kojima M; Nakanishi N; Mori H und Kangawa K. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**(12):5854-9.
- (154) Nagaya N; Uematsu M; Kojima M; Ikeda Y; Yoshihara F; Shimizu W; Hosoda H; Hirota Y; Ishida H; Mori H und Kangawa K. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation* 2001;**104**(12):1430-5.
- (155) Nakazato M; Murakami N; Date Y; Kojima M; Matsuo H; Kangawa K und Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001;**409**(6817):194-8.
- (156) National Center for Biotechnology Information of the National Library of Medicine and the Institutes of Health. Locus Link for Ghrelin. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/LocRpt.cgi?l=51738> 2003;.
- (157) Nilsson,G; Simon,J; Yalow,RS und Berson,SA. Plasma gastrin and gastric acid responses to sham feeding in dogs. *Gastroenterology* 1972;. **63**, 51-59.
- (158) Niswender KD; Morton GJ; Stearns WH; Rhodes CJ; Myers MG, Jr. und Schwartz MW. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 2001;**413**(6858):794-5.
- (159) Norrelund H; Hansen TK; Orskov C; Hosada H; Kojima M; Kangawa K; Weeke J; Moller N; Christiansen J und Jorgensen JO. Ghrelin immunoreactivity in human plasma is suppressed by somatostatin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;**57**:539-46.
- (160) Obal JF; Alt J; Taishi P; Gardi J und Krueger JM. Sleep in mice with non-functional growth hormone releasing hormone receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002.
- (161) Obici,S; Feng,Z; Karkanas,G; Baskin DG und Rossetti L.. Decreasing hypothalamic insulin receptors cause hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat.Neurosci.* 2002;. **5**, 566-572.
- (162) Okada,K; Ishii,S; Minami,S; Sugihara,H; Shibasaki,T und Wakabayashi,I. Intracerebroventricular administration of the growth hormone -releasing peptide K-102 increases food intake in free-feeding rats. *Endocrinology* 1996;. **137**, 5155-5158.
- (163) Okumura H; Nagaya N; Enomoto M; Nakagawa E; Oya H und Kangawa K. Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous Peptide from the stomach. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;**39**(6):779-83.

-
- (164) Ong H; Bodart V; McNicoll N; Lamontagne D und Bouchard C. Binding sites for growth hormone-releasing peptides. *Growth Horm IGF Res* 1998;**8**:137-40.
- (165) Pandya N; DeMott-Friberg R; Bowers CY; Barkan AL und Jaffe CA. Growth hormone (GH)-releasing peptide-6 requires endogenous hypothalamic GH-releasing hormone for maximal GH stimulation.
- (166) Papotti M; Cassoni P; Volante M; Deghenghi R; Muccioli G und Ghigo E. Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**(10):5052-9.
- (167) Papotti M; Ghe C; Cassoni P; Catapano F; Deghenghi R; Ghigo E und Muccioli G. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**(10):3803-7.
- (168) Pederson,RA; Schubert,HE und Brown,JC. Gastric inhibitory polypeptide. Its physiologic release and insulinotropic action in the dog. *Diabetes* 1975;. **25**, 1050-1054.
- (169) Peeters A.; Barendregt,JJ; Willekens,F; Mackenbach,JP; AlMamun,A; Bonneux,L und NEDCOM,tNEaDCoMRG. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann.Intern.Med.* 2003;. **138**(1), 24-32.
- (170) Peino R; Baldelli R; Rodriguez-Garcia J; Rodriguez-Segade S; Kojima M; Kangawa K; Arvat E; Ghigo E; Dieguez C und Casanueva FF. Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *Eur J Endocrinol* 2000;**143**(6):R11-R14.
- (171) Penalva A; Baldelli R; Camina JP; Cerro AL; Micic D; Tamburrano G; Dieguez C und Casanueva FF. Physiology and possible pathology of growth hormone secretagogues. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;**14 Suppl 5**:1207-12.
- (172) Penman,E; Wass,JA; Medbak,S; Morgan,L; Lewis,JM; Besser,GM und et al. Response of circulating immunoreactive somatostatin to nutritional stimuli in normal subjects. *Gastroenterology* 1981;. **81**, 692-699.
- (173) Petersenn S. Growth hormone secretagogues and ghrelin: an update on physiology and clinical relevance. *Horm Res* 2002;**58 Suppl 3**:56-61.
- (174) Petersenn S; Rasch AC; Peshorn M; Beil FU und Schulte HM. Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 2001;**142**:2649-59.
- (175) Pittman QJ; Taché Y und Brown M. Bombesin acts in preoptic areas to produce hypothermia in rats. *Life Sci* 1980;**26**:725.
- (176) Pollak,C; Green,J und Smith,G. Blood glucose prior to meal request in humans isolated from all temporal cues. *Physiol.Behav.* 1989;. **46**, 529-534.
- (177) Pombo M; Pombo CM; Garcia A; Caminos E; Gualillo O; Alvarez CV; Casanueva FF und Dieguez C. Hormonal control of growth hormone secretion. *Horm Res* 2001;**55 Suppl 1**:11-6.
- (178) Popovic V; Damjanovic S.; Micic D; Djurovic M.; Dieguez C und Casanueva F. Blocked growth hormone-releasing peptide (GHRP-6)-induced GH secretion and absence of synergic action of

- GHRP-6 plus GH-releasing hormone in patients with hypothalamopituitary disconnection: evidence that GHRP-6 main action is exerted at hypothalamic level. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;**80**:942-7.
- (179) Rigamonti AE; Pincelli AI; Corra B; Viarengo R; Bonomo SM; Galimberti D; Scacchi M; Scarpini E; Cavagnini F und Muller EE. Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *J Endocrinol* 2002;**175**(1):R1-R5.
- (180) Rigamonti,AE; Pincelli,AI; Corra,B; Viarengo,R; Bonomo,SM; Gilamberti,D; Sacci,M; Scarpini,E; Cavagnini,F und Muller,E. Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *J Endocrinol.* 2002;. **175**, R1-R5.
- (181) Riley LG; Hirano T und Grau EG. Rat Ghrelin Stimulates Growth Hormone and Prolactin Release in the Tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoolog Sci* 2002;**19**(7):797-800.
- (182) Roelfsema F; Biermasz NR; Veldman RG; Veldhuis JD; Frolich M; Stokvis-Brantsma WH und Wit JM. Growth hormone (GH) secretion in patients with an inactivating defect of the GH-releasing hormone (GHRH) receptor is pulsatile: evidence for a role for non-GHRH inputs into the generation of GH pulses. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**(6):2459-64.
- (183) Rosicka M; Krsek M; Jarkovska Z; Marek J und Schreiber V. Ghrelin - a new endogenous growth hormone secretagogue. *Physiol Res* 2002;**51**(5):435-41.
- (184) Saad MF; Bernaba B; Hwu CM; Jinagouda S; Fahmi S; Kogosov E und Boyadjian R. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**(8):3997-4000.
- (185) Sakata I; Nakamura K; Yamazaki M; Matsubara M; Hayashi Y; Kangawa K und Sakai T. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened- type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 2002;**23**(3):531-6.
- (186) Sattler HP; Lensch R und Rhode V. Novel amplification unit at chromosome 3q25-27 in human prostate cancer. *Prostate* 2000;**45**:207-15.
- (187) Schaller,G; Schmidt,A; Pleiner,J; Woloszczuk,W; Wolztm,M und 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.
- (188) Schmidt R, Lang F, Thews G. Physiologie des Menschen. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 1993.
- (189) Schusdziarra,V. Somatostatin: Biological actions and Pathophysiology. *Prog.Basic Clin.Pharmacol.* 1996;. **10**, 35-53.
- (190) Schusdziarra,V; Bender,H und Pfeiffer,EF. Release of bombesin-like immunoreactivity from the isolated perfused rat stomach. *Regul.Pept.* 1993;. **7**, 21-29.
- (191) Schusdziarra,V; Harris,V; Conlon,JM; Arimura,A und Unger,R. Pancreatic and gastric somatostatin release in response to intragastric and intraduodenal nutrients and HCL in the dog. *J clin invest* 1978;. **62**, 509-518.
- (192) Schwartz MW; Seeley RJ; Campfield LA; Burn P und Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 1996;**98**(5):1101-6.

-
- (193) Schwartz,MW. Brain pathways controlling food intake and body weight. *Exp.Biol.Med.* 2001; **226**, 978-981.
- (194) Schwartz MW; Peskind E; Raskind M; Boyko EJ und Porte D, Jr.. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med* 1996;**2**(5):589-93.
- (195) Schwartz,MW; Woods,S; Porte,D; Seeley,RJ und Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;. **404**, 661-671.
- (196) Seoane LM; Tovar S; Baldelli R; Arvat E; Ghigo E; Casanueva FF und Dieguez C. Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely- moving rats. *Eur J Endocrinol* 2000;**143**(5):R7-R9.
- (197) Shiiya T; Nakazato M; Mizuta M; Date Y; Mondal MS; Tanaka M; Nozoe S; Hosoda H; Kangawa K und Matsukura S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**(1):240-4.
- (198) Shimada M; Date Y; Mondal MS; Toshinai K; Shimbara T; Fukunaga K; Murakami N; Miyazato M und Kangawa K. Somatostatin supresses ghrelin secretion from the rat stomach. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**320**:520-5.
- (199) Shimada M; Tritos NA; Lowell BB; Flier JS und Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 1998;. **39**, 670-674.
- (200) Shuto Y; Shibasaki T; Otagiri A; Kuriyama H; Ohata H; Tamura H; Kamegai J; Sugihara H; Oikawa S und Wakabayashi I. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest* 2002;**109**(11):1429-36.
- (201) Shuto Y; Shibasaki T; Wada K; Parhar I; Kamegai J; Sugihara H; Oikawa S und Wakabayashi I. Generation of polyclonal antiserum against the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R): evidence that the GHS-R exists in the hypothalamus, pituitary and stomach of rats. *Life Sci* 2001;**68**(9):991-6.
- (202) Sibilía V; Pagani F; Guidobono F; Locatelli V; Torsello A; Deghenghi R und Netti C. Evidence for a central inhibitory role of growth hormone secretagogues and ghrelin on gastric Acid secretion in conscious rats. *Neuroendocrinology* 2002;**75**(2):92-7.
- (203) Sibilía V; Rindi G; Pagani F; Rapetti D; Locatelli V; Torsello A; Campanini N; Deghenghi R und Netti C. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action.
- (204) Simms,EA; Danforth,E und Horton,EF. Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man. *Recent Prog.Horm.Res.* 1973;. **29**, 457-496.
- (205) Skinner M; Nass R; Lopes B; Laws E und Thorner O. Growth hormone secretagogue receptor expression in human pituitary tumours. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**:4314-20.
- (206) Smith,G. Introduction to the reviews on peptides and the control of food intake and body weight. *Neuropeptides* 1999;. **33**, 323-334.

-
- (207) Smith RG; Feighner S; Prendergast K; Guan X und Howard A. A New Orphan Receptor Involved in Pulsatile Growth Hormone Release. *Trends Endocrinol Metab* 1999;**10**(4):128-35.
- (208) Sugino T; Hasegawa Y; Kikkawa Y; Yamaura J; Yamagishi M; Kurose Y; Kojima M; Kangawa K und Terashima Y. A transient ghrelin surge occurs just before feeding in a scheduled meal-fed sheep. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;**295**(2):255-60.
- (209) Sugino,T; Yamamura,J; Yamagishi,M; Kurose,Y; Kojima,M; Kangawa,K; Hasegawa,Y und Terashima,Y. Involvement of cholinergic neurons in the regulation of the ghrelin secretory response to feeding in sheep. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2003;. **304**, 308-312.
- (210) Sugita M; Tanaka N und Davidson S. Molecular definition of a small amplification domain within 3q26 in tumors of cervix,ovary and lung. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;**117**:9-18.
- (211) Takaya K; Ariyasu H; Kanamoto N; Iwakura H; Yoshimoto A; Harada M; Mori K; Komatsu Y; Usui T; Shimatsu A; Ogawa Y; Hosoda K; Akamizu T; Kojima M; Kangawa K und Nakao K. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**(12):4908-11.
- (212) Tamura H; Kamegai J; Shimizu T; Ishii S; Sugihara H und Oikawa S. Ghrelin stimulates GH but not food intake in arcuate nucleus ablated rats. *Endocrinology* 2002;**143**(9):3268-75.
- (213) Tannenbaum GS; Bowers CY. Interactions of growth hormone secretagogues and growth hormone-releasing hormone/somatostatin. *Endocrine* 2001;**14**(1):21-7.
- (214) Tannenbaum GS; Epelbaum J und Bowers CY. Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology* 2003;**144**(3):967-74.
- (215) Tannenbaum GS; Lapointe M; Beudet A und Howard AD. Expression of growth hormone secretagogue-receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 1998;**139**(10):4420-3.
- (216) Thomas G.; Fairhall K. und Robinson IC. Activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by the growth hormone (GH) secretagogue GH-releasing peptide-6 in rats. *Endocrinology* 1997;**138**:1585-91.
- (217) Tivesten A; Bollano E; Caidahl K; Kujacic V; Sun XY; Hedner T; Hjalmarsen A; Bengtsson BA und Isgaard J. The growth hormone secretagogue hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. *Endocrinology* 2000;**141**:60-6.
- (218) Tolle V; Bassant MH; Zizzari P; Poindessous-Jazat F; Tomasetto C; Epelbaum J und Bluet-Pajot MT. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* 2002;**143**(4):1353-61.
- (219) Tolle V; Kadem M; Bluet-Pajot MT; Frere D; Foulon C; Bossu C; Dardennes R; Mounier C; Zizzari P; Lang F; Epelbaum J und Estour B. Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**(1):109-16.
- (220) Tolle V; Zizzari P; Tomasetto C; Rio MC; Epelbaum J und Bluet-Pajot MT. In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 2001;**73**(1):54-61.

- (221) Torsello A; Bresciani E; Rossoni G; Avallone R; Tulipano G; Cocchi D; Bulgarelli I; Deghenghi R; Berti F und Locatelli V. Ghrelin Plays a Minor Role in the Physiological Control of Cardiac Function in the Rat. *Endocrinology* 2003;**144**(5):1787-92.
- (222) Torsello,A; Locatelli,V; Melis,M; Succu,S; Spano,MS; Deghenghi,R; Muller,E und Argiolas,A. Differential orexigenic effects of hexarelin and its analogs in the rat hypothalamus: indication for multiple growth hormone secretagogue receptor subtypes. *Neuroendocrinology* 2000;. **72**, 327-332.
- (223) Torsello,A; Luoni,M; Schweiger,F; Grilli,R; Guidi,M; Bresciani,E; Deghenghi,R; Muller,E und Locatelli,V. Novel hexarelin analogs stimulate feeding in the rat through a mechanism not involving growth hormone release. *Eur.J Pharmacol.* 1998;. **360**, 123-129.
- (224) Trudel L; Bouin M; Tomasetto C; Eberling P; StPierre S; Bannon P; L`Heureux MC und Poitras P. Two new peptides to improve post-operative gastric ileus in dog. *Peptides* 2003;**24**(4):531-4.
- (225) Trudel L; Tomasetto C; Rio MC; Bouin M; Plourde V; Eberling P und Poitras P. Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;**282**(6):G948-G952.
- (226) Tschop M; Smiley DL und Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000;**407**(6806):908-13.
- (227) Tschop M; Statnick MA; Suter TM und Heiman ML. Adipogenic effect of a ghrelin receptor antagonist: Lessons from mice lacking neuropeptide Y. *Endocrinology* 2002;**in press!!**
- (228) Tschop M; Wawarta R; Riepl RL; Friedrich S; Bidlingmaier M; Landgraf R und Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 2001;**24**(6):RC19-RC21.
- (229) Tschop M; Weyer C; Tataranni PA; Devanarayan V; Ravussin E und Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001;**50**(4):707-9.
- (230) Ukkola O; Ravussin E; Jacobson P; Snyder EE; Chagnon M; Sjostrom L und Bouchard C. Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**(8):3996-9.
- (231) Volante M; Allia E; Gugliotta P; Funaro A; Broglio F; Deghenghi R; Muccioli G; Ghigo E und Papotti M. Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**(3):1300-8.
- (232) Wajnrajch,MP; Ten,IS; Gertner,JM und Leibel,RL. Genomic organization of the human ghrelin gene. *J Enocr Genet* 2000;. **1**, 231-233.
- (233) Walsh JH; Richardson CT und Fordtran S. pH dependence of acid secretion and gastrin release in normal ulcer objects. *J clin invest* 1975;**55**:462-8.
- (234) Weber,E; Evans,CJ; Chang,J und Barchas,JD. Brain distributions of alpha neo-endorphin and beta-neo-endorphin: evidence for regional processing differences. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1982;. **108**, 81-88.

-
- (235) Wechsler JGH. Adipositas: Ursachen und Therapie. Berlin;Wien;[u.a.]: Blackwell Wissenschafts-Verlag, 1998.
- (236) Weigle,DS. Appetite and the regulation of body weight. *FASEB J.* 1994;. **8**, 302-310.
- (237) Weikel JC; Wichniak A; Ising M; Brunner H; Friess E; Held K; Mathias S; Schmid DA; Uhr M und Steiger A. Ghrelin promotes slow-wave sleep in man. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002.
- (238) Wells T; Houston PA. Skeletal growth acceleration with growth hormone secretagogues in transgenic growth retarded rats: pattern-dependent effects and mechanisms of desensitization. *J Neuroendocrinol* 2001;**13**(6):496-504.
- (239) Willesen MG; Kristensen P und Romer J. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 1999;**70**:306-16.
- (240) Williams,DL; Grill,HJ; Cummings,DE und Kaplan,JM. Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology* 2003;. **144**, 5184-5187.
- (241) Wills G; Hansky J und Smith G. Ventricular, paraventricular and circumventricular structures involved in peptide-induced satiety. *Regul Pept* 1984;**9**:87.
- (242) Wirth A. Adipositas-Fiebel. 2.Auflage ed. Berlin Hedelberg NewYork: Springer-Verlag, 2003.
- (243) Woods SC; Seeley RJ; Porte D Jr und Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 1998;. **280**, 1378-1383.
- (244) Woods SC; Stein L; Figlewicz DP und Parke D. Bombesin stimulates insulin secretion and reduces food intake in the baboon. *Peptides* 1983;**4**:687-90.
- (245) Woods,S; Lotter,E; McKay,L und Porte,D. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 1979;. **282**, 503-505.
- (246) Woussen-Colle,MC; Willems,G und Graef,FD. Relationship of the gastrin response to the amount of food ingested in normal subjects. *Digestion* 1977;. **15**, 322-328.
- (247) Wren AM; Seal LJ; Cohen MA; Brynes AE; Frost GS; Murphy KG; Dhillon WS; Ghatei MA und Bloom SR. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**(12):5992.
- (248) Wren AM; Small CJ; Abbott CR; Dhillon WS; Seal LJ; Cohen MA; Batterham RL; Taheri S; Stanley SA; Ghatei MA und Bloom SR. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 2001;**50**(11):2540-7.
- (249) Wren AM; Small CJ; Ward HL; Murphy KG; Dakin CL; Taheri S; Kennedy AR; Roberts GH; Morgan DG; Ghatei MA und Bloom SR. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 2000;**141**(11):4325-8.
- (250) Yalow,RS und Berson,SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J clin invest* 1960;. **39**, 1157-1175.

- (251) Yamazaki M; Nakamura K; Kobayashi H; Matsubara M; Hayashi Y; Kangawa K und Sakai T. Regulational effect of ghrelin on growth hormone secretion from perfused rat anterior pituitary cells. *J Neuroendocrinol* 2002;**14**(2):156-62.
- (252) Yoshihara F; Kojima M; Hosoda H; Nakazato M und Kangawa K. Ghrelin: a novel peptide for growth hormone release and feeding regulation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;**5**(4):391-5.
- (253) Zhang W; Chen M; Chen X; Segura BJ und Mulholland MW. Inhibition of pancreatic protein secretion by ghrelin in the rat. *J Physiol* 2001;**537**(Pt 1):231-6.
- (254) Zhang,Y; Proenca,R; Maffei,M; Friedman JM; Leopold L und Barone M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;. **372**, 425-432.

10. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir im Labor, bei der Interpretation der Daten sowie beim Verfassen der Arbeit mit ihrem Sachverstand zur Seite standen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr.med. Schusdziarra für die Überlassung des Themas, die Einbindung in seine Forschungsgruppe und die motivierende Unterstützung. Für die Vermittlung der Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens, vor allem im Rahmen der regelmäßigen Doktorandenseminare, ebenso wie für die Nutzung des Labors bin ich neben ihm auch Herrn Professor Dr.med. Allescher sehr dankbar.

Fernerhin möchte ich Herrn Professor em. Dr.med.Drs.hc.mult. Classen, sowie seinem Nachfolger, Herrn Professor Dr.med. Schmid für die freundliche Aufnahme in die II.Medizinische Klinik und die Nutzung der technischen Einrichtungen danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr.med. Lippl für die Vermittlung der praktischen Fertigkeiten und die Beratung bei der Planung und Interpretation der Versuche. Vor allem aber bin ich ihm dankbar, dass er mich über die vielen Mißerfolge des experimentellen Arbeitens hinweg motivieren konnte.

Für die Durchführung der Radioimmunoassays danke ich Frau Herda sehr herzlich.

Ebenfalls zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Zimmermann und Herrn Dr.med. Sibaeve, die mir bei der Lösung technischer Probleme im Labor tagtäglich mit ihrer Erfahrung zur Seite standen.