

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Gastrale Ghrelin- und Obestatinsekretion bei der Ratte

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Rosa Derya Golluscio

aus

München

2011

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Priv. Doz. Dr. med. Bärbel Otto

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Reinhardt Zachoval

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr.med. Florian Lippl

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2011

Meinen Eltern und meinem Bruder

Inhalt:

1. Einleitung	7
2. Material und Methodik	11
2.1. Übersicht	11
2.2. Versuchstiere	11
2.3. Präparation der Ratten	11
2.4. Versuchsaufbau der Magenperfusion	14
2.5. Versuchsprotokolle	15
2.5.1. Auswirkungen des Nervus vagus auf die Ghrelinssekretion	15
2.5.2. Auswirkungen des Nervus vagus auf die Obestatinsekretion	16
2.5.3. Auswirkungen von Peptidhormonen auf die Ghrelin- und Obestatinsekretion	17
2.5.3.1. Effekt von Obestatin auf die Ghrelinssekretion	18
2.5.3.2. Effekt von Insulin auf die Obestatinsekretion	19
2.5.3.3. Effekt von Acyl-Ghrelin auf die Obestatinsekretion	19
2.5.3.4. Effekt von Desacyl-Ghrelin auf die Obestatinsekretion	20
2.5.4. Auswirkungen von Alter und Gewicht der Ratten	21
2.6. Messungen der Peptidkonzentration	22
2.6.1. Prinzip des Radioimmunoassays	22
2.6.2. Ghrelinsbestimmung	22
2.6.3. Obestatinbestimmung	23
2.6.4. Statistische Auswertung	23
3. Ergebnisse	24
3.1. Auswirkungen des Nervus vagus auf die Ghrelinssekretion	24
3.2. Auswirkungen des Nervus vagus auf die Obestatinsekretion	26
3.3. Auswirkungen von Peptidhormonen auf die Ghrelinssekretion	27

3.3.1. Effekt von Adiponektin auf die vagal prästimulierte Total-Ghrelinsekretion	27
3.3.2. Effekt von Resistin auf die vagal prästimulierte Acyl- und Desacyl-Ghrelinsekretion	27
3.3.3. Effekt von Apelin auf die vagal prästimulierte Desacyl-Ghrelinsekretion	29
3.3.4. Effekt von Obestatin auf die Ghrelinsekretion	30
3.3.4.1. Effekt von Obestatin auf die vagal prästimulierte Total-Ghrelinsekretion	30
3.3.4.2. Effekt von Obestatin auf die vagal prästimulierte Acyl-Ghrelinsekretion	32
3.3.4.3. Effekt von Obestatin auf die vagal prästimulierte Desacyl-Ghrelinsekretion	33
3.4. Auswirkungen von Peptidhormonen auf die Obestatinsekretion	34
3.4.1. Effekt von Insulin auf die Obestatinsekretion	34
3.4.2. Effekt von Ghrelin auf die Obestatinsekretion	35
3.4.2.1. Effekt von Acyl-Ghrelin auf die Obestatinsekretion	35
3.4.2.2. Effekt von Desacyl-Ghrelin auf die Obestatinsekretion	36
3.5. Auswirkungen von Alter und Gewicht der Ratten	37
4. Allgemeine Diskussion	38
4.1. Struktur von Obestatin	38
4.2. Vorkommen und Lokalisation von Obestatin	38
4.3. Spezielle Wirkung auf das Verdauungssystem	40
4.4. Wirkung auf bestimmte Organsysteme	41
4.4.1. Das Auge	41
4.4.2. Die Ovarien	41
4.4.3. Das Zentrale Nervensystem	42
4.4.4. Der Schlafrythmus und das Trinkverhalten	43
4.4.5. Das Magenkarzinom	43
4.4.6. Das Pankreas	45

5.	Spezielle Diskussion	46
5.1.	Auswirkungen des Nervus vagus auf die Ghrelin- und Obestatinsekretion	46
5.2.	Auswirkungen von Adiponektin auf die Ghrelinsekretion	47
5.3.	Auswirkungen von Resistin auf die Ghrelinsekretion	49
5.4.	Auswirkungen von Apelin auf die Ghrelinsekretion	50
5.5.	Auswirkungen von Obestatin auf die Ghrelinsekretion	52
5.6.	Auswirkungen von Insulin auf die Obestatinsekretion	55
5.7.	Auswirkungen von Acyl- und Desacyl- Ghrelin auf die Obestatinsekretion	56
5.8.	Auswirkungen von Alter und Gewicht der Ratten	58
6.	Zusammenfassung	60
7.	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	63
8.	Abkürzungen	69
9.	Literaturverzeichnis	71
10.	Danksagung	80

1. Einleitung

Im Jahre 2005 registrierte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) 1,6 Milliarden Erwachsene weltweit als übergewichtig ($\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$) und ca. 400 Millionen als fettleibig ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$). Prospektive Studien deklarieren, dass 2015 bis zu 2,3 Billionen Menschen übergewichtig sein werden und sich darunter ca. 20 Millionen Kinder unter 5 Jahren befinden. Neuste Studien haben aufgezeigt, dass in den USA 64,5 % der Bevölkerung übergewichtig ist, 24,5 % sogar fettleibig. In Zahlen ausgedrückt sind 119 Millionen Amerikaner zu dick. Berechnungen zu Folge könnte die mittlere Lebenserwartung der amerikanischen Bevölkerung um vier Jahre verlängert werden, hätten alle Menschen Normalgewicht.

Auch in Europa ist inzwischen eine ähnliche Entwicklung zu beobachten, so wurde bei bis zu 80% der erwachsenen Bevölkerung ein Body-Mass-Index (BMI) von über 25 kg/m^2 festgestellt. Der durchschnittliche BMI in der europäischen Region liegt bei fast 26,5. Definitionsgemäß ist ein Drittel der erwachsenen Bevölkerung hier zu Lande als adipös einzustufen ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$) (1).

Nur noch 1/3 der Bevölkerung weist ein gesundheitlich wünschenswertes Körpergewicht ($\text{BMI} 20\text{-}25 \text{ kg/m}^2$) auf. Besorgniserregend findet man auch bei Kindern und Jugendlichen zunehmende BMI-Zahlen, so sind etwa 20% der Kinder übergewichtig und ein Drittel davon ist sogar adipös ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$).

Die gesundheitlichen Konsequenzen können bereits in den Krankenhäusern und Kliniken beobachtet werden. So konnten die Framingham- und Nurses Health- Studie aufzeigen, dass koronare Herzkrankheiten, Diabetes mellitus Typ II, ischämische Insulte, arterielle Hypertonie, Arthrosen und viele weitere adipositas-assoziierte Erkrankungen auf dem Vormarsch sind und darüber hinaus früher auftreten.

In einer Gesellschaft, in der 24,2% der Frauen und 28,9% der Männer das Idealgewicht um mehr als 20% überschreiten, ist es von essentieller Bedeutung diese Entwicklung aufzuhalten. Berechnungen zufolge werden jährlich bis zu 15 Milliarden Euro für adipositas-assoziierte Erkrankungen ausgegeben, was 6% der Gesundheitsausgaben der Bundesrepublik Deutschland entspricht. Es wird geschätzt, dass fettleibige Menschen in Großbritannien 18 Millionen Krankheitstage pro Jahr verursachen, dass 30 000 Todesfälle jährlich eintreten, dass insgesamt 40.000 Arbeitsjahre verloren gehen, und dass sich die durchschnittliche Lebensdauer um 9 Jahre verkürzt (2).

Die Entstehung des Übergewichts beruht auf einem multifaktoriellen Geschehen, so sind sowohl exogene als auch endogene Faktoren daran beteiligt. Neben einem verminderten Energieverbrauch, der sich aus dem Grundumsatz (50-70%), aus dem Verbrauch bei körperlicher Bewegung (20-40%) und aus der nahrungsabhängigen Thermogenese (10%) zusammensetzt, liegt die Hauptursache für die Entstehung der Adipositas in Industrienationen v. a. in einer überhöhten Energiezufuhr (3).

So führt ein Ungleichgewicht zwischen Kalorienaufnahme einerseits und Energieverbrauch andererseits zu einer globalen Zunahme der Adipositas. Die weltweite Verlagerung der Nahrungsmittelzusammensetzung hin zu fett- und zuckerreichen Lebensmitteln mit geringem Vitamin- und Mineralgehalt sowie die Verminderung der körperlichen Aktivität können als Hauptfaktoren in der Ätiologie des Übergewichts gesehen werden.

Aufgrund der weltweit steigenden Anzahl übergewichtiger Menschen ist das Interesse der Forscher an medikamentösen Therapieoptionen groß.

Die zurzeit erhältlichen pharmazeutischen Präparate erzeugen einen eher moderaten Effekt auf die Reduktion des Körpergewichts, auch dürfen ihre potentiellen Nebenwirkungen nicht unterschätzt werden. Zudem kann die initial erreichte Gewichtsreduktion meistens nicht über einen langen Zeitraum gehalten werden. Eine effektive Methode zur signifikanten Gewichtsreduktion liegt in einer invasiven Magenband-Operation oder in einer vertikalen Gastroplastik nach Mason. Beide Verfahren erweisen sich aber aufgrund hoher Kosten und hoher Komplikationsraten (5-15%) bzw. Mortalitätsraten <1% nicht als omnipotente Lösung im Kampf gegen die weltweite Adipositas. Interessant ist, dass dieses operative Verfahren neben der flächenhaften Verminderung des gastralen Fassvolumens auch zu einer Veränderung der gastrointestinalen Hormone wie z.B. PYY, GLP-1 und Ghrelin führt (4). So konnte bei diesen Patienten ein verminderter präprandialer Ghrelinanstieg sowie eine verringerte kumulative Ghrelinsekretion beobachtet werden, welche möglicherweise die Gewichtsabnahme beeinflusst (4).

Evidente Studien deklarierten den Magen-Darm-Trakt als endokrin aktives Organ („little brain“), welches regulative Peptidhormone sezerniert (4, 5). Durch diese Peptidhormone erhält das ZNS über neuronale Signalwege Informationen zur Steuerung von Appetit und Sättigung.

Aus diesem Grund könnte in der Verabreichung gastrointestinaler Hormone oder deren Antagonisten ein neuer Stellenwert in der Behandlung der Adipositas gesehen werden. Der

Vorteil an einer solchen Therapie läge in dem physiologischen Wirkmechanismus der Peptidhormone auf den menschlichen Organismus und einer damit verbundenen geringeren Nebenwirkungsrate. Die geringe Halbwertszeit sowie die Tatsache, dass sie z.T. nicht enteral resorbiert werden können, stellen jedoch einen Nachteil dar.

Die Erkenntnis, dass das Peptidhormon Ghrelin als ein Hauptsignal für die Entwicklung einer positiven Energiebalance fungiert, führt zu dem Bestreben einen pharmazeutischen Antagonisten zur Bekämpfung der Adipositas zu entwickeln.

Es ist bereits bekannt, dass das endogen aus dem Magen sezernierte Ghrelin über neuronale Bahnen die Hypophyse stimuliert und somit das Hungergefühl stärkt, was letztlich zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme und einer Gewichtszunahme führt. Darüber hinaus stimuliert es die gastrointestinale Motilität (6,7), die gastrale Säuresekretion (8), die exokrine Pankreasenzymsekretion (9) und die Adipogenese (10,11), wohingegen es den Energieverbrauch (6), den Fett- Katabolismus, die Lipolyse (10,12) und die Adipozyten-Apoptose (11) hemmt. Zusammenfassend steigert Ghrelin nicht nur die Nahrungsaufnahme, sondern es beeinflusst auch eine Reihe von Prozessen, die am Energiehaushalt beteiligt sind und letztlich eine Gewichtszunahme zur Folge haben können.

Wissenschaftler entdeckten ein neues Peptidhormon namens Obestatin, welches genau wie das Ghrelin aus dem Vorläuferpeptid Präproghrelin entsteht und durch die Veresterung am C-Terminus biologisch aktiviert wird. Dieses Peptid ist möglicherweise an der Regulation des Energiehaushaltes beteiligt: es scheint die Nahrungsaufnahme zu vermindern, das Körpergewicht zu reduzieren und die Magenentleerung durch Hemmung der jejunalen Kontraktion zu verzögern (13,14).

Ratten, denen Obestatin intracerebral und intraperitoneal verabreicht wurde, aßen signifikant weniger als die Vergleichsgruppe. Auch eine Verminderung der gastralen Motilität, sowie eine bei gleichzeitiger Verabreichung gegensätzliche Wirkung des Obestatins zum Ghrelin, ließen die Hypothese aufkommen, dass dieses Peptidhormon einen signifikanten Einfluss auf den Energiemetabolismus haben könnte (13). Andererseits haben andere Arbeiten gezeigt, dass Obestatin keinen eindeutigen Effekt auf die Nahrungsaufnahme hat (15).

Aus diesem Grund legten wir im Rahmen dieser Promotion unser Augenmerk auf die Auswirkung exogen zugeführter Hormone auf die Ghrelin-Sekretion.

Unser Ziel ist es mit besonderer Aufmerksamkeit einen hemmenden Effekt von Obestatin auf die Ghrelin-Ausschüttung aufzuzeigen.

Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit sollten durch *in vitro* Versuche am isolierten Rattenmagen folgende Fragestellungen geklärt werden:

- 1.) Wie wirkt der Nervus vagus auf die gastrale Obestatin- und Ghrelinsekretion?
- 2.) Welchen Einfluss haben gastrointestinale Hormone (Obestatin, Resistin, Apelin und Adiponektin) auf die vagal prästimulierte Ghrelinsekretion?
- 3.) Welchen Effekt haben Alter und Körpergewicht auf die Ghrelinfreisetzung?
- 4.) Welche Auswirkungen haben Ghrelin und Insulin auf die *in vitro* Freisetzung von Obestatin?

2. Material und Methodik

2.1. Übersicht

Die Versuche wurden am isolierten Rattenmagen durchgeführt. Ziel der Präparation nach einer von Schusdziarra und Mitarbeitern 1983 (16) 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 der Ratten

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

Die Präparation begann mit der Eröffnung des Abdomens durch einen etwa 5 cm langen Längsschnitt median 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 maius nach Ligatur der sie versorgenden Gefäße unter Schonung der Vasa gastro-omentalia an der großen Kurvatur. Das Pankreas, das größtenteils im Mesenterium des Duodeni liegt, wurde durch Ligatur der Gefäße vom Duodenum abgesetzt. Nun wurde das Duodenum ca. zwei Zentimeter distal des Pylorus doppelt ligiert und dazwischen durchtrennt.

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, Durchmesser 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 (Durchmesser 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 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. Versuchsaufbau der Magenperfusion

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.

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller</u>
Adiponectin	BACHEM Biochemica GmbH, Heidelberg
Actrapid	Novo Nordisk Pharma GmbH, Kopenhagen, Dänemark
Apelin	BACHEM Biochemica GmbH, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbogen	Linde AG, Wiesbaden
Glucose 5%ige Lösung	Deltaselect GmbH, Pfuldingen
Humanalbumin 20%	Pharmacia & Upjohn GmbH
Insulin	BACHEM Biochemica GmbH, Heidelberg
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat, primäres	Merck, Darmstadt
Liquemin 2500IE/5ml	Roche AG, Grenzach-Wyhlen
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid 0,9%ige Lösung	Deltaselect GmbH, Pfuldingen
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Apotheke der Medizinischen Klinik Innenstadt, München
Obestatin	BACHEM Biochemica GmbH, Heidelberg
Resistin	BACHEM Biochemica GmbH, Heidelberg
Salzsäure 1M	Apotheke der Medizinischen Klinik Innenstadt, München

Tabelle 1: Herkunftsverzeichnis der verwendeten Substanzen

2.5. Versuchsprotokolle

Nach der Präparation ging den eigentlichen Messungen eine Äquilibrationsphase von 15 Minuten voraus, während dieser Zeit wurde das Perfusat verworfen. Daraufhin wurden die Proben in einem einminütigen Intervall gesammelt und eingefroren. Bei einigen Experimenten wurde zusätzlich eine Stimulation der Nervi vagi vorgenommen, welche durch einen elektrischen Rechteckimpulsgeber monophasisch bei einer Spannung von 10 Volt und einer Impulsdauer von 1 Millisekunde durchgeführt worden war. Die Frequenz wurde konstant auf 10 Hz gehalten und der intragastrale pH wurde auf 2,0 eingestellt.

2.5.1. Auswirkungen des Nervus vagus auf die Ghrelinsekretion

Ein Großteil der Versuche im Rahmen dieser Arbeit betrachtet den Effekt verschiedener Peptidhormone auf die vagal vorstimulierte Ghrelinsekretion. Daher ist es nötig primär zu klären, ob die elektrische Stimulation des Nervus vagus auch über bestimmte Zeiträume von 10, 20 und 30 Minuten eine konstant elevierte Sekretion hervorzurufen vermag.

Diese Versuche wurden 1ms bei einem intragastralen pH von 2,0 und einer Stimulationsfrequenzen von 10 Hz durchgeführt. Der vagalen Stimulation gingen eine Äquilibrierungsphase von 15 Minuten und eine zehnmütige Vorlaufphase voraus. Die Experimente endeten schließlich mit einer 15-minütigen Endlaufphase.

Intragastral: NaCl-Lösung 0,9%, pH 2			
Krebs-Ringer-Puffer			
15 min	10 min	Vagusstimulation über 10, 20 oder 30 Minuten mit 10 Hz	15 min
Äquilibrierung	Vorlauf		Endlauf

Abbildung 1:

Versuchsordnung zur Überprüfung des Effektes des Nervus vagus in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer auf die Ghrelinsekretion. In der gesamten Zeit wurde der Magen luminal mit einer auf pH 2 titrierten Natriumchloridlösung und vaskulär mit einer Krebs-Ringer-Puffer-Lösung perfundiert. Dabei schloss sich der Äquilibrierungsphase eine Vorlauf- und Stimulationsphase sowie eine abschließende Endlaufperiode.

2.5.2. Einfluss des Nervus vagus auf die Obestatinsekretion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine direkte Interaktion des Nervus vagus mit dem Obestatin untersucht. Der Äquilibrierungs- und Vorlaufphase schloss sich eine über 20 Minuten durchgehenden Stimulation des Nervus vagus an. Dieser Phase folgte dann wiederum eine zehnmütige Nachlaufphase. Anschließend wurde mittels Elisa der Verlauf der Obestatinausscheidung registriert.

Intragastral: NaCl-Lösung 0,9%, pH 2			
Krebs-Ringer-Puffer			
15 min	10 min	Vagusstimulation über 20 Minuten mit 10 Hz	15 min
Äquilibrierung	Vorlauf		Endlauf

Abbildung 2:

Überprüfen des Effektes des Nervus vagus auf die Obestatinsekretion. Während des gesamten Experiments wurde der Magen luminal mit einer auf pH 2 titrierten Natriumchloridlösung und vaskulär mit einer Krebs-Ringer-Puffer-Lösung perfundiert. Dabei schloss sich der Äquilibrierungsphase eine Vorlauf- und Stimulationsphase an sowie die abschließende Endlaufperiode.

2.5.3. Auswirkungen verschiedener Peptidhormone auf die Ghrelinsekretion

Um die Auswirkungen der Hormone Resistin, Adiponektin, Apelin und Obestatin auf die Ghrelinsekretion aufzuzeigen, wurde das im folgendem beschriebene Versuchschema angewandt. Dabei ging dem gesamten Versuch eine 15-minütige Äquilibrierungsphase voran, erst dann begann die eigentliche Messung über 55 Minuten. Einer Basalperiode, in welcher der Magen über 10 Minuten lediglich mit reiner Pufferlösung perfundiert wurde, folgte eine 30 minütige vagale Stimulationsphase mit 10 Hz. Nach 10 minütiger Stimulation wurde das vaskulär fließende substanzfreie Puffergemisch ausgetauscht und von einem mit den jeweiligen Hormon in entsprechender Konzentration versetzten Krebs-Ringer-Puffer-Lösung ersetzt. Nach wiederum 10 Minuten wurde das Hormongemisch entfernt und mit der ursprünglichen Lösung über die restliche verbleibende Zeit weiter perfundiert. Die vagale Stimulation wurde nach insgesamt 30 Minuten beendet und von einer 15-minütigen Endlaufphase ersetzt.

Intragastral: NaCl-Lösung 0,9%, pH 2					
Krebs-Ringer-Puffer					
		Vagusstimulation 10 Hz			
15 min	10 min	10 min	10 min	10 min	15 min
Äquilibration	Vorlauf	Stimulation	Hormon und Stimulation	Stimulation	Endlauf

Abbildung 3:

Versuchsschema zur Überprüfung der Auswirkung gastrointestinaler Hormone auf die Ghrelinsekretion. Während des gesamten Experiments wurde der Magen luminal mit einer auf pH 2 titrierten Natriumchloridlösung und vaskulär mit einer Krebs-Ringer-Puffer-Lösung perfundiert. Die jeweiligen getesteten Hormone wurden in entsprechender Konzentration einer separaten Pufferlösung beigemischt und nach einer 10 minütigen vagalen Vorstimulation, über 10 Minuten perfundiert. Die Nachstimulation erfolgte wieder in reiner Pufferlösung und schließlich wurde der Versuch mit einer 15-minütigen Endlaufphase abgeschlossen.

2.5.3.1. Effekt von Obestatin auf die Ghrelinsekretion

Durch Perfusion des Magens mittels einer mit Obestatin versetzten Pufferlösung, lag die Intention dieses Versuches darin, die antagonistische Wirkung des Obestatin auf seinen Gegenspieler Acyl-Ghrelin unabhängig von der vagalen Beeinflussung aufzuzeigen.

Folglich wurde der Magen nach einer 15-minütigen Äquilibrationsphase und einer 10-minütigen Basalphase mit dem Obestatinpuffer über 20 Minuten perfundiert, dabei aber nicht vagal stimuliert. Der Versuch wurde mit einer 15-minütigen Nachlaufphase, in der wieder nur mit der reinen Pufferlösung perfundiert wurde, beendet.

Intragastral: NaCl-Lösung 0,9%, pH 2			
Krebs-Ringer-Puffer			
15 min	10 min	20 min	15 min
Äquilibration	Vorlauf	Obestatin ohne Vagusstimulation	Endlauf

Abbildung 4:

Überprüfung der antagonistischen Wirkung des Obestatins auf die gastrale Ghrelinsekretion. Der Magen wurde in dieser Versuchsanordnung luminal konstant mit einer auf pH 2 titrierten Natriumchloridlösung perfundiert und vaskulär zunächst mit einer reinen Pufferlösung, dann nach 25 Minuten mit einer Obestatin versetzten Lösung und letztendlich wieder mit der substanzfreien Flüssigkeit perfundiert.

2.5.3.2. Effekt von Insulin auf die Obestatinsekretion

Nachdem eine Insulin-Signal-Kaskade im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen wurde und damit eine mögliche Interaktion mit gastral sezernierten Hormonen denkbar wäre, lag unser Interesse darin, einen direkten Effekt des Insulins auf das ebenfalls gastral ausgeschüttete Obestatin aufzuzeigen. Demzufolge wurde der isolierte Rattenmagen *in vitro* nach 15-minütiger Äquibrierungsphase zunächst 10 Minuten mit einem reinen Puffergemisch und im Anschluss ohne Vagusstimulation über 15 Minuten mit einem Insulin (10^{-8}M) versetzten Puffergemisch vaskulär perfundiert. Danach folgte eine viertelstündige Zwischenlaufphase mit substanzfreien Puffer, der sich wiederum eine 15-minütige Phase anschloss, in der der Magen erneut mit einem Insulin (10^{-6}M) versetzten Puffer in höherer Konzentrierung perfundiert wurde. Abschließend wurde das Experiment mit einem viertelstündigen Endlauf beendet.

Intragastral: NaCl-Lösung 0,9%, pH 2					
Krebs-Ringer-Puffer					
15 min	10 min	15 min	15 min	15 min	15 min
Äquibrierung	Vorlauf	Insulin (10^{-8}M) ohne Vagusstimulation	Zwischenlauf	Insulin (10^{-6}M) ohne Vagusstimulation	Endlauf

Abbildung 5:

Überprüfung der Wirkung des Insulins auf die Obestatinsekretion. Der Magen wurde in dieser Versuchsanordnung luminal konstant mit einer auf pH 2 titrierten Natriumchloridlösung perfundiert und vaskulär abwechselnd mit reiner Pufferlösung und mit Insulin versetzten Puffergemischen perfundiert.

2.5.3.3. Effekt von Acyl-Ghrelin auf die Obestatinsekretion

Die Wirkung des Acyl-Ghrelin auf die Obestatinsekretion am isolierten Rattenmagenmodell sollte in diesem Versuchsablauf gezeigt werden. So wurde der präparierte Magen nach einer 15-minütigen Äquibrierungsphase zunächst mit einer substanzfreien Pufferlösung perfundiert und dann anschließend über 20 Minuten mit einem Acyl-Ghrelin versetzten Puffer perfundiert. Hierauf wurde der Versuch mit einem 15-minütigen Endlauf abgeschlossen.

Intragastral: NaCl-Lösung 0,9%, pH 2			
Krebs-Ringer-Puffer			
15 min	10 min	20 min	15 min
Äquilibrierung	Vorlauf	Acyl-Ghrelin (10^{-9}M , 10^{-7}M) ohne Vagusstimulation	Endlauf

Abbildung 6:

Überprüfung der antagonistischen Wirkung des Acyl-Ghrelins auf die gastrale Obestatinsekretion. Der Magen wurde in dieser Versuchsanordnung luminal konstant mit einer auf pH 2 titrierten Natriumchloridlösung perfundiert und vaskulär zunächst mit einer reinen Pufferlösung, dann nach 25 Minuten mit einer Obestatin versetzten Lösung und letztendlich wieder mit der substanzfreien Flüssigkeit perfundiert.

2.5.3.4. Effekt von Desacyl-Ghrelin auf die Obestatinsekretion

Eine synergistische Wirkung zum Obestatin auf die Magenentleerung und die Nahrungsaufnahme konnte *in vivo* bereits für das Desacyl-Ghrelin aufgezeigt werden. So wird beiden Hormonen eine anorektische Wirkung nachgesagt, daher liegt das Interesse darin, diese Ergebnisse auch für *in vitro* Versuche zu reproduzieren.

In dem vorliegenden Versuchsablauf wurde der präparierte Rattenmagen nach Äquilibrierung abwechselnd zunächst mit einem reinen Puffergemisch und anschließend mit einem Desacyl-Ghrelingemisch über 15 Minuten perfundiert. Daran schloss sich ein 15-minütiger Zwischenlauf an, dem erneut eine 15-minütige Desacyl-Ghrelin Perfusion folgte. Beendet wurde das Experiment mit einer 15-minütigen Endlaufphase.

Intragastral: NaCl-Lösung 0,9%, pH 2					
Krebs-Ringer-Puffer					
15 min	10 min	15 min	15 min	15 min	15 min
Äquilibration	Vorlauf	Desacyl-Ghrelin (10^{-9} M) ohne Vagusstimulation	Zwischenlauf	Desacyl-Ghrelin (10^{-7} M) ohne Vagusstimulation	Endlauf

Abbildung 7:

Versuchsordnung zur Überprüfung der Wirkung des Desacyl-Ghrelin auf die gastrale Obestatinsekretion. Der Magen wurde in dieser Versuchsordnung luminal konstant mit einer auf pH 2 titrierten Natriumchloridlösung perfundiert und vaskulär abwechselnd mit reiner Pufferlösung sowie mit Desacyl-Ghrelin perfundiert.

2.5.4. Auswirkungen von Alter und Gewicht der Ratten

In diesem Experiment wurden die Mägen von jungen bzw. normalgewichtigen (328 ± 18 g) und alten, übergewichtigen Ratten (540 ± 52 g) mit einer Krebs-Ringer-Puffer-Lösung infundiert. Damit sollte die Auswirkungen des Alterns und des Körpergewichts auf die Ghrelinsekretion aufgezeigt werden. Der 10-minütigen Basalperiode, in der weder vagal stimuliert noch eine Substanz zugefügt wurde, ging eine 15-minütige Äquilibration voraus. Dann folgte die mit 10 Hz über insgesamt 20 Minuten verlaufende Stimulationsphase. Schließlich wurde der Versuch mit einer 15-minütigen Nachlaufphase beendet.

Intragastral: NaCl-Lösung 0,9%, pH 2			
Krebs-Ringer-Puffer			
15 min	10 min		15 min
Äquilibration	Vorlauf	Vagusstimulation über 20 Minuten mit 10 Hz	Endlauf

Abbildung 8:

Versuchsordnung zur Testung des Einflusses der Körpermasse und des Alters auf die Ghrelinsekretion. In der gesamten Zeit wurde der Magen luminal mit einer auf pH 2 titrierten Natriumchloridlösung und vaskulär mit einer Krebs-Ringer-Puffer-Lösung perfundiert. Dabei folgte einer Äquilibrationsphase eine Vorlauf- und Stimulationsphase sowie eine abschließende Endlaufperiode.

2.6. Messungen der Peptidkonzentration

2.6.1. Prinzip des Radioimmunassays

Die Bestimmung der Ghrelinkonzentration in den Proben erfolgte radioimmunologisch auf Grundlage der erstmals 1960 von Yalow und Berson beschriebenen Technik (17). Das Prinzip des Radioimmunoassays besteht darin, dass das in einer Probe in unbekannter Konzentration enthaltene Antigen mit einem zugesetzten radioaktiv markierten Antigen, dem sogenannten „Tracer“, um Bindungsstellen eines spezifischen Antikörpers, der im Unterschluß vorliegt, konkurriert. Da die Antigen-Antikörper-Bindung reversibel ist, stellt sie chemisch gesehen eine Gleichgewichtsreaktion dar, so dass sich nach einer Inkubationszeit das Verhältnis des gebundenen Tracers zu gebundenem unmarkiertem Antigen dem Verhältnis der Konzentrationen entspricht. Nach der Trennung von freiem und gebundenem Antigen mittels Immunpräzipitation oder Adsorption an Aktivkohle mit anschließender Zentrifugation und Dekantierung kann im Szintillations-Gamma-Zähler die Radioaktivität der Probe gemessen werden, die mit der Konzentration des zu bestimmenden Peptids korreliert. Durch Messung verschiedener bekannter Konzentrationen des Peptids in einer Standardverdünnungsreihe, kann ein Faktor für die Umrechnung von Gamma-Zählern in Peptidkonzentration ermittelt werden.

2.6.2. Ghrelinbestimmung

Die Ghrelinkonzentration wurde in jeder zweiten 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 ^{125}I markiertes Rattenghrelin als Tracer zugesetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde der zweite Antikörper und das 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. Sowohl für Desacyl- als auch Acyl-Ghrelin wurde der gleiche Kit von der Firma LINCO, Missouri (USA) verwendet.

2.6.3. Obestatinbestimmung

Aus jeder zweiten ungeraden Probe wurde die Obestatinkonzentration bestimmt. Hierfür wurde ein im Handel erhältlicher Obestatin Radioimmunoassay Kit (Phoenix Pharmaceuticals, USA) verwendet. Entsprechend den Anweisungen des Herstellers wurden die Proben mit Obestatinantikörpern vom Kaninchen über 24 Stunden inkubiert, anschließend wurde ein ¹²⁵I markiertes Rattenobestatin als Tracer zugesetzt. Um die Antikörper nun auszufällen wurde nach weiteren 24 Stunden der zweite Antikörper und das Schafserum zugesetzt. Nach Zentrifugierung und Absaugen erfolgte die automatisierte Messung im Gamma-Zähler. Die Sensitivität des Assays lag bei 215.5 pg/ml. Der Variationskoeffizient zwischen den Assays betrug 12%, innerhalb der Assays 5%. Durch regelmäßige Mitbestimmung in verschiedenen Konzentrationen wurde eine Kreuzreaktivität der infundierten Substanzen mit dem Antikörper ausgeschlossen.

2.6.4. Statistische Auswertung

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. Auswirkungen des Nervus vagus auf Ghrelinsekretion

Eine 20-minütige Vagusstimulation führte zu einer signifikanten Steigerung der Total-/ Acyl-/ und Desacyl- Ghrelinsekretion. So ergaben sich für das Total-Ghrelin eine Zunahme von 1777 ± 1675 pg bei 20-minütiger Vagusstimulation ($n=7$, $p<0,05$) und bei 30 Minuten ein Zuwachs von 665 ± 457 pg ($n=7$, $p<0,05$).

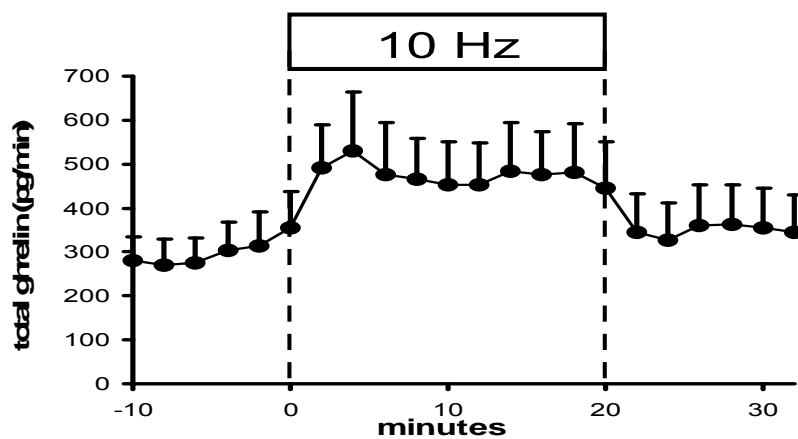


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Veränderung des Total-Ghrelin bei einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 20 Minuten und einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

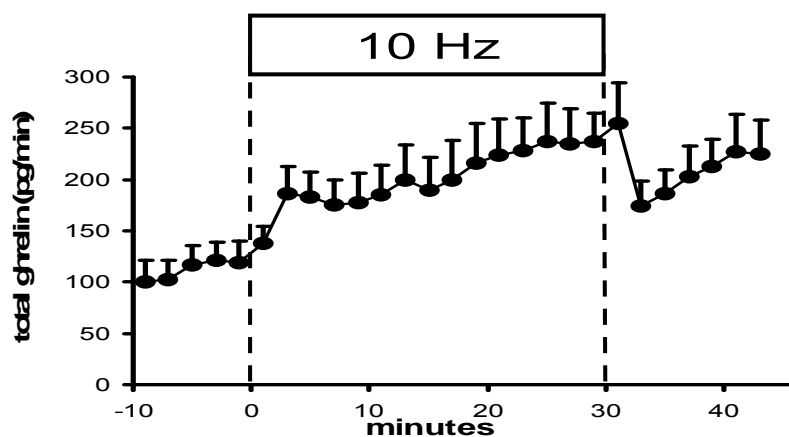


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Veränderung des Total-Ghrelin bei einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 30 Minuten und einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $\text{pg}/\text{min} \pm \text{SEM}$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Für Acyl-Ghrelin ergab sich rechnerisch eine signifikante Erhöhung von $236 \pm 226 \text{ pg}/10 \text{ min}$ ($n=7$, $p<0,05$). Des Weiteren veränderte die Vagusstimulation auch die Desacyl-Ghrelinsekretion signifikant um den Wert $845 \pm 150 \text{ pg}/10 \text{ min}$ ($n=6$, $p<0,05$).

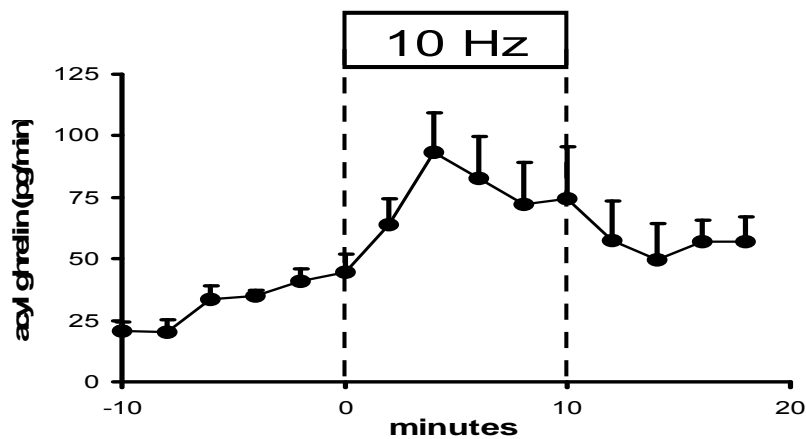


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Veränderung des Acyl-Ghrelin bei einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 10 Minuten und einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $\text{pg}/\text{min} \pm \text{SEM}$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

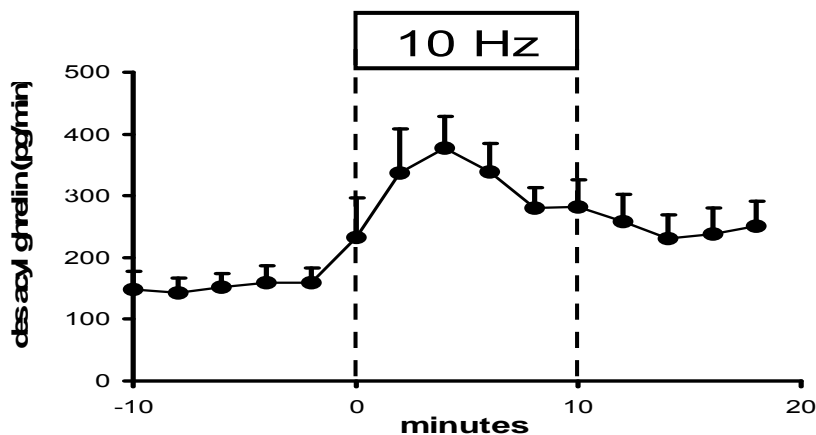


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Veränderung des Desacyl-Ghrelin bei einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 10 Minuten und einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $\text{pg}/\text{min} \pm \text{SEM}$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

3.2. Auswirkungen des Nervus vagus auf die Obestatinsekretion

Eine elektrische Stimulation des Nervus vagus zeigte keine Beeinflussung der Obestatinausscheidung. Rechnerisch ergab sich eine geringe Reduktion des Obestatin von $1,4 \pm 4,3$ pg/ 20 min (n=8, p>0,05).

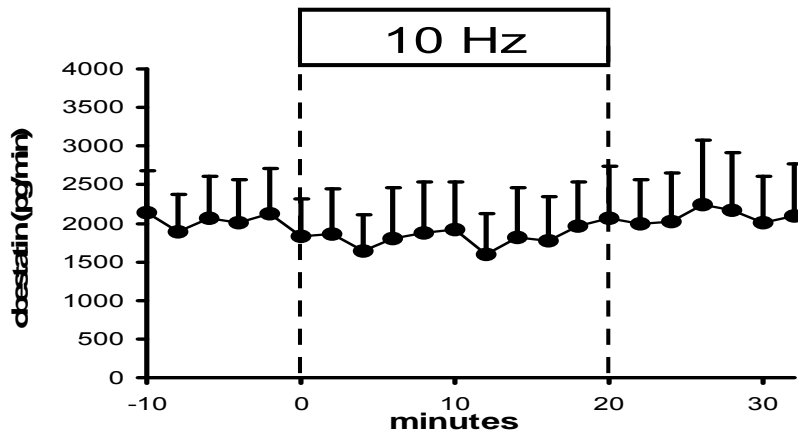


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Veränderung der Obestatinsekretion bei einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 20 Minuten und einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

3.3. Auswirkungen von Peptidhormonen auf die Ghrelinsekretion

3.3.1. Effekt von Adiponektin auf die vagal prästimulierte Total-Ghrelinsekretion

Adiponektin in der Konzentration 10^{-8} M konnte eine signifikante Verringerung der Total-Ghrelinsekretion induzieren. Die Messwerte ergaben rechnerisch eine Verminderung von $1561 \text{ pg/10 min} \pm 739 \text{ pg}$ ($n=4$, $p<0,05$).

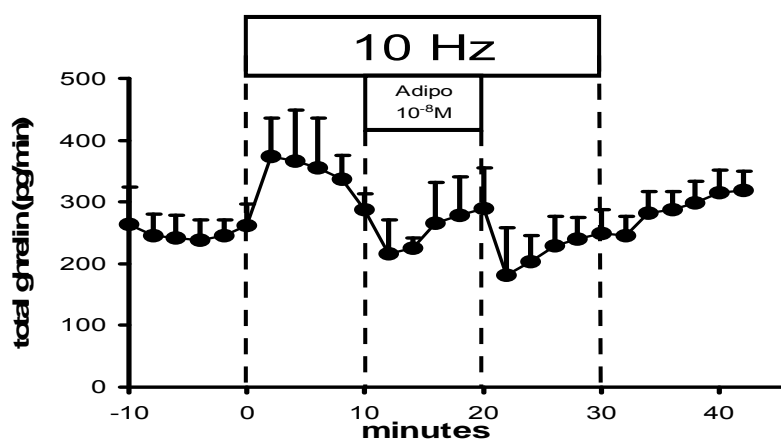


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Veränderung der Total-Ghrelinsekretion bei einer 10-minütigen Infusion von Adiponektin in einer Konzentration von 10^{-8} M ($n=4$) während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $\text{pg/min} \pm \text{SEM}$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

3.3.2. Effekt von Resistin auf die vagal prästimulierte Acyl- und Desacyl-Ghrelinsekretion

Die Perfusion von Resistin in der Konzentration 10^{-8} M hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Aktiv-Ghrelin Sekretion. So zeigte sich rechnerisch eine Zunahme von $234 \pm 462 \text{ pg/10 min}$ ($n=4$, $p>0,05$).

Zudem ergaben sich keine signifikanten Veränderungen der Desacyl-Ghrelinsekretion bei einer Infusion mit Resistin in den Konzentrationen 10^{-8} M und 10^{-10} M. Die Messwerte zeigten jeweils für die angegebenen Konzentrationen eine Steigerung von $480 \text{ pg/10 min} \pm 2586 \text{ pg}$ ($n=4$, $p>0,05$) und $96 \text{ pg/10 min} \pm 1139 \text{ pg}$ ($n=3$, $p>0,05$).

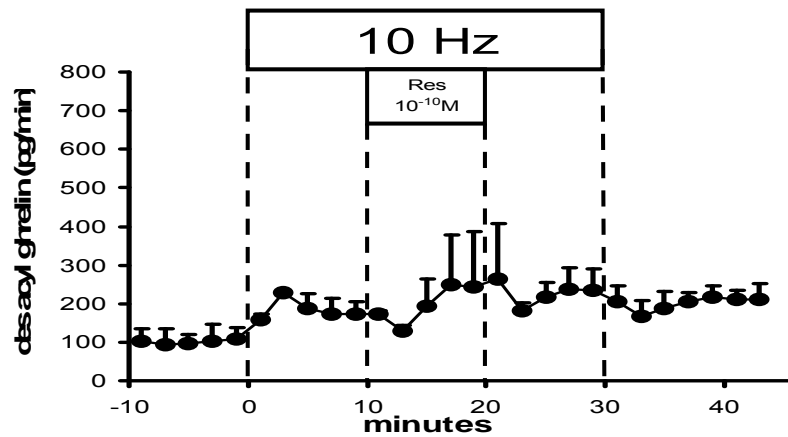


Abbildung 15: Graphische Darstellung der Veränderung der Desacyl-Ghrelinsekretion bei Infusion von Resistin in einer Konzentration von 10^{-10} M (n=4) während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

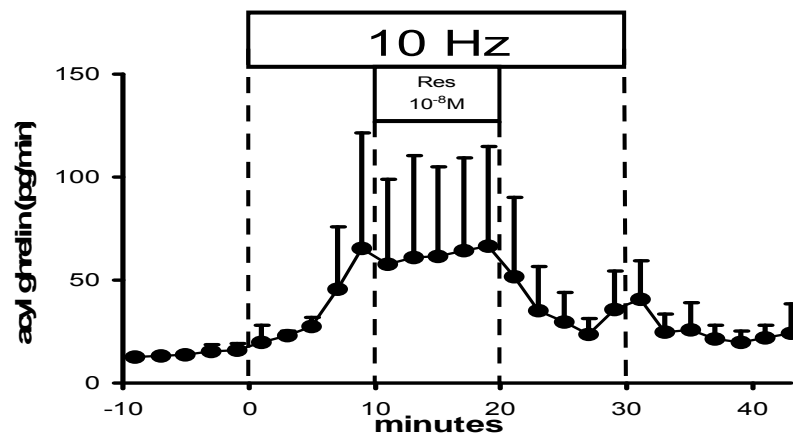


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Veränderung der Acyl-Ghrelinsekretion bei Infusion von Resistin in einer Konzentration von 10^{-8} M (n=4) während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

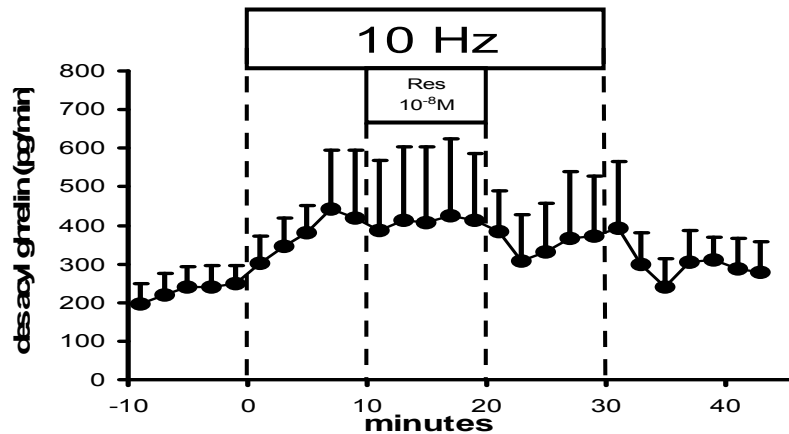


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Veränderung der Desacyl-Ghrelinsekretion bei Infusion von Resistin in einer Konzentration von 10^{-8} M ($n=4$) während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $\text{pg}/\text{min} \pm \text{SEM}$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

3.3.3. Effekt von Apelin auf die vagal prästimulierte Desacyl-Ghrelinsekretion

Unter vagaler Vorstimulation hatten die Infusionen mit Apelin in den Konzentrationen 10^{-10} M und 10^{-8} M keine bedeutsame Auswirkung auf die Desacyl-Ghrelinsekretion.

Es zeigte sich eine Verminderung von $476 \pm 884 \text{ pg}/10 \text{ min}$ ($n=2$, $p>0,05$) für die Konzentration 10^{-10} M, wohingegen bei Erhöhung der Konzentration auf 10^{-8} M keine Tendenz mehr erkennbar war $0,5 \pm 1782 \text{ pg}/10 \text{ min}$ ($n=4$, $p>0,05$).

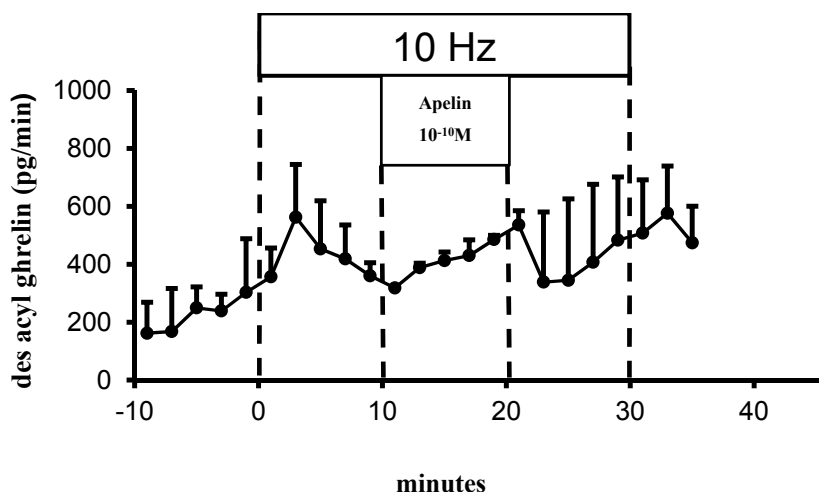


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Veränderung der Desacyl-Ghrelinsekretion bei Infusion von Apelin in einer Konzentration von 10^{-10} M ($n=2$) während einer 30-minütigen konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $\text{pg}/\text{min} \pm \text{SEM}$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

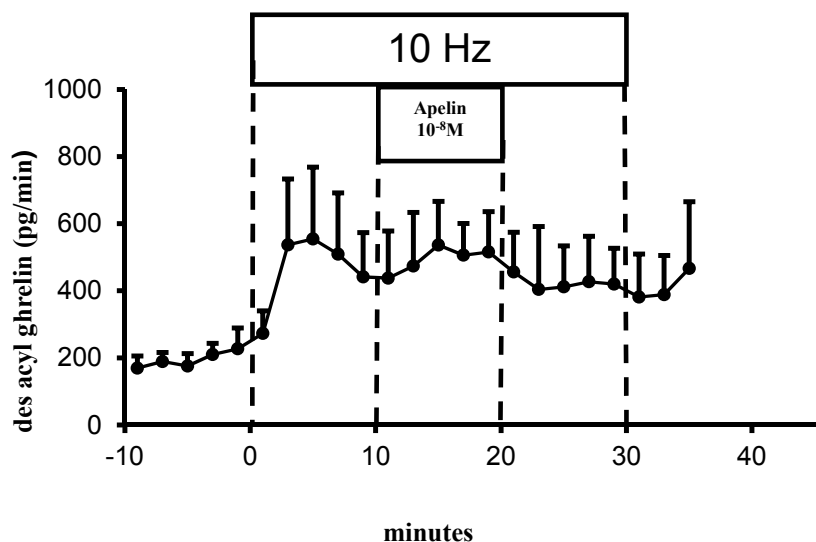


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Veränderung der Desacyl-Ghrelinsekretion bei Infusion von Apelin in einer Konzentration von 10^{-8}M ($n=4$) während einer 30 minütigen konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $\text{pg}/\text{min} \pm \text{SEM}$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

3.3.4. Effekt von Obestatin auf die Ghrelinsekretion

3.3.4.1. Effekt von Obestatin auf die vagal prästimulierte Total-Ghrelinsekretion

In dieser Versuchsanordnung wurde die Wirkung des Obestatins in den Konzentrationen 10^{-11}M , 10^{-9}M und 10^{-7}M auf die totale Ghrelinsekretion geprüft. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Effekt, allerdings fiel ein deutlicher „off-Effekt“ nach Beendigung der Obestatininfusion auf. Rechnerisch ergaben sich die folgenden Messwerte: $2274 \pm 1701 \text{ pg}/10 \text{ min}$ ($n=4$, $p>0,05$) für 10^{-11}M , $16 \pm 1303 \text{ pg}/10 \text{ min}$ ($n=6$, $p>0,05$) für 10^{-9}M sowie $214 \pm 436 \text{ pg}/10 \text{ min}$ ($n=8$, $p>0,05$) für 10^{-7}M .

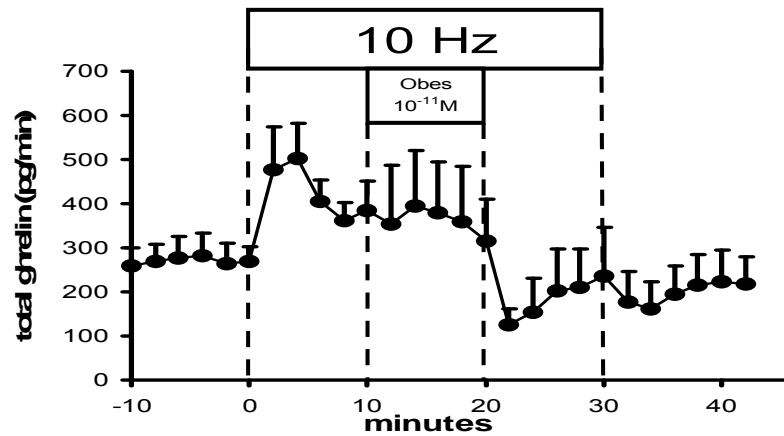


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Veränderung der Total-Ghrelinsekretion bei einer 10-minütigen Infusion von Obesatin in einer Konzentration von 10^{-11} M (n=4) während eines intragastralen pH-Werts von 2 und einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

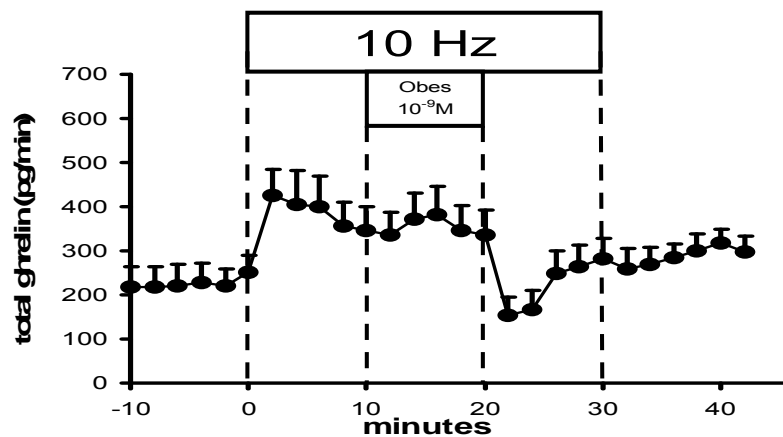


Abbildung 21: Graphische Darstellung der Veränderung der Total-Ghrelinsekretion bei einer 10-minütigen Infusion von Obesatin in einer Konzentration von 10^{-9} M (n=4) während eines intragastralen pH-Werts von 2 und einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

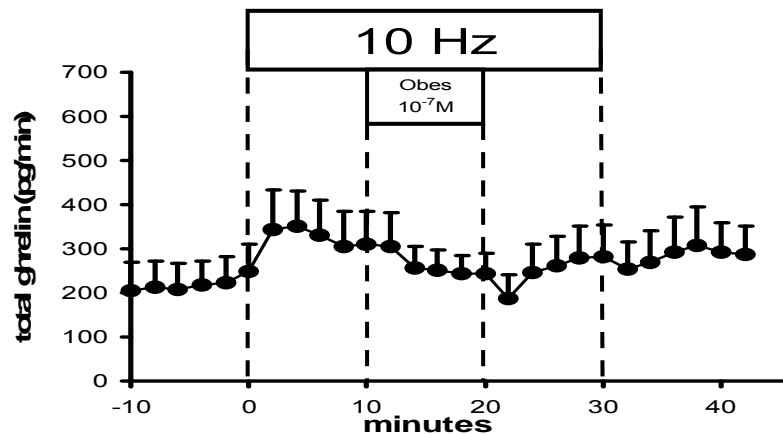


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Veränderung der Total-Ghrelinsekretion bei einer 10-minütigen Infusion von Obestatin in einer Konzentration von $10^{-7}M$ ($n=4$) während eines intragastralen pH-Werts von 2 und einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $pg/min \pm SEM$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

3.3.4.2. Effekt von Obestatin auf die vagal prästimulierte Acyl-Ghrelinsekretion

Eine Infusion von Obestatin in der Konzentration $10^{-7}M$ bei vagaler Vorstimulation zeigte keinen Effekt auf die Ausscheidung des Acyl-Ghrelins. Auch hier fiel wiederum ein deutlicher „off-Effekt“ nach Beendigung der Obestatininfusion auf. Demgemäß erschienen folgende Werte: $92 \pm 245 pg/10 min$ ($n=3$, $p>0,05$).

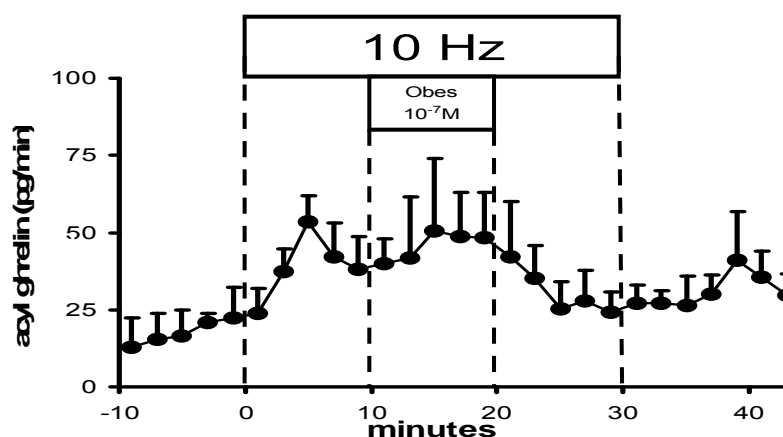


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Veränderung der Acyl-Ghrelinsekretion bei einer 10-minütigen Infusion von Obestatin in einer Konzentration von $10^{-7}M$ ($n=3$) während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 30 Minuten und einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $pg/min \pm SEM$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

3.3.4.3. Effekt von Obestatin auf die vagal prästimulierte Desacyl-Ghrelinsekretion

Bei der Infusion von Obestatin in der Konzentration 10^{-9}M zeigte sich bei gleichzeitiger vagaler Vorstimulation eine tendenzielle Steigerung der Desacyl-Ghrelin Sekretion, so ergaben sich die folgenden Messwerte $870 \pm 715 \text{ pg/10 min}$ ($n=4$, $p>0,05$).

Wohingegen eine Erhöhung der Konzentration auf 10^{-8}M eine signifikante Stimulation der Desacyl-Ghrelinkonzentration auf $1289 \pm 1956 \text{ pg/10 min}$ ($n=4$, $p>0,05$) nach sich zog.

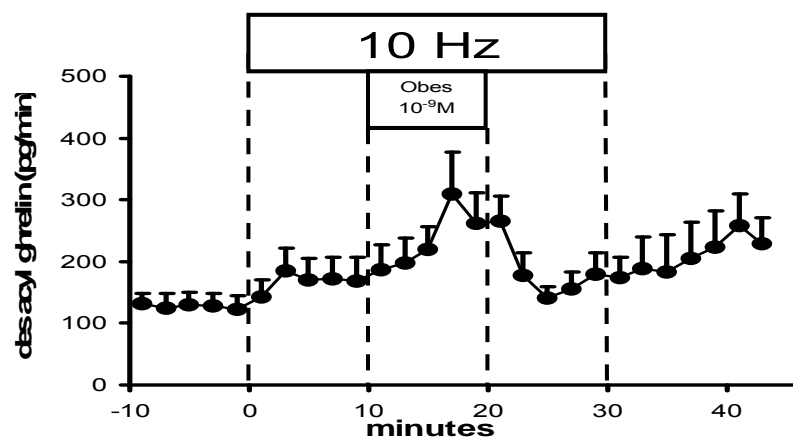


Abbildung 24: Graphische Darstellung der Veränderung der Desacyl-Ghrelinsekretion bei einer 10-minütigen Infusion von Obestatin in einer Konzentration von 10^{-9}M ($n=4$) während eines intragastralen pH-Werts von 2 und einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $\text{pg/min} \pm \text{SEM}$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

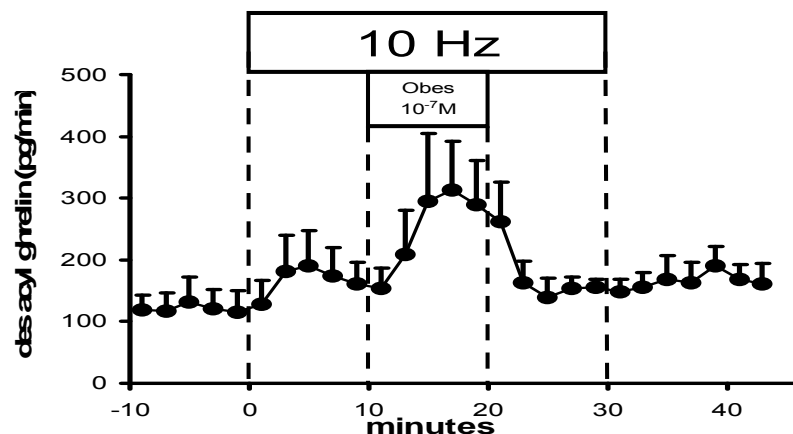


Abbildung 25: Graphische Darstellung der Veränderung der Desacyl-Ghrelinsekretion bei einer 10-minütigen Infusion von Obestatin in einer Konzentration von 10^{-7}M ($n=4$) während eines intragastralen pH-Werts von 2 und einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $\text{pg/min} \pm \text{SEM}$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

3.4. Auswirkungen von Peptidhormonen auf die Obestatinsekretion

3.4.1. Effekt von Insulin auf die Obestatinsekretion

Die Infusion von Insulin zeigte in der Konzentration 10^{-8}M eine tendenzielle Abnahme der Obestatinsekretion mit einem Unterschied von $0,8 \pm 0,932 \text{ pg/ 15 min}$ ($n=6, p>0,05$).

Die Konzentration 10^{-6}M hingegen ergab keinen signifikanten Einfluss auf die Obestatinsekretion. So ergab sich rechnerisch eine Differenz von $0,1 \pm 0,5 \text{ pg pg/ 15 min}$ ($n=6, p>0,05$).

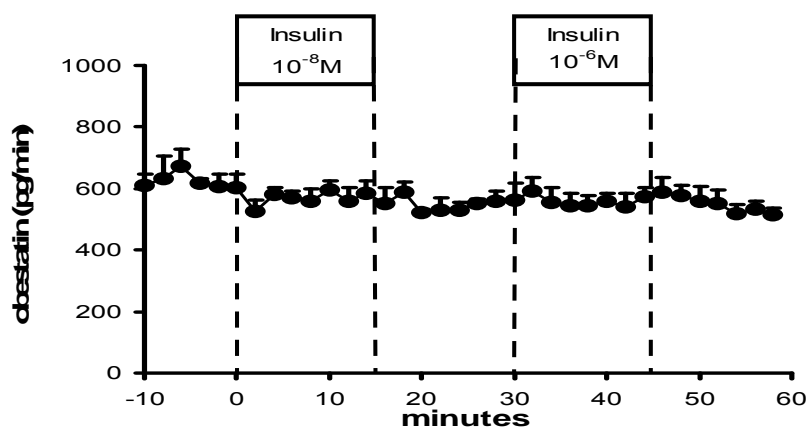


Abbildung 26: Graphische Darstellung der Veränderung der Obestatinsekretion bei Infusion von Insulin in einer Konzentration von 10^{-8}M ($n=6$) und 10^{-6}M ($n=6$) über einen Zeitraum von 15 Minuten bei einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $\text{pg/min} \pm \text{SEM}$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

3.4.2. Effekt von Ghrelin auf die Obestatinsekretion

3.4.2.1. Effekt von Acyl-Ghrelin auf die Obestatinsekretion

Die Perfusion mit Acyl-Ghrelin in einer Konzentration von 10^{-9} M erbrachte keinen Effekt auf die Obestatinfreisetzung, rechnerisch fanden sich folgende Werte: $0,438 \pm 0,59$ pg/ 20 min ($n=5$, $p>0,05$).

Wohingegen eine Konzentrationssteigerung auf 10^{-7} M eine signifikante Verringerung der Sekretion von Obestatin von $2,14 \pm 1,713$ pg/ 20 min ($n=7$, $p<0,05$) erbrachte.

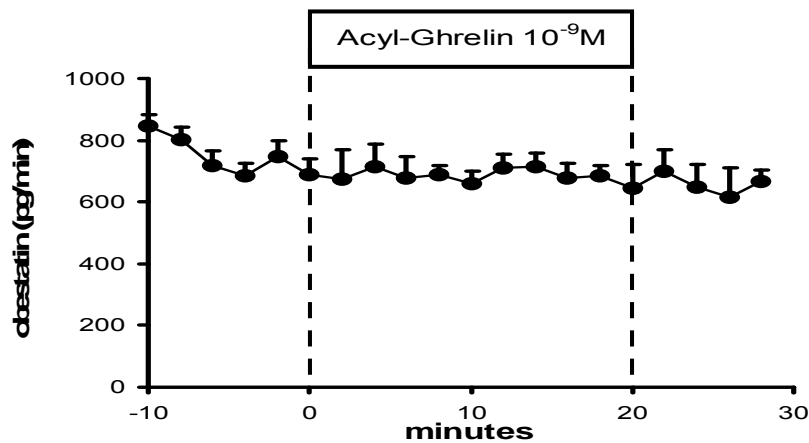


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Veränderung der Obestatinsekretion bei Infusion von Acyl-Ghrelin in einer Konzentration von 10^{-9} M ($n=5$) über einen Zeitraum von 20 Minuten sowie einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

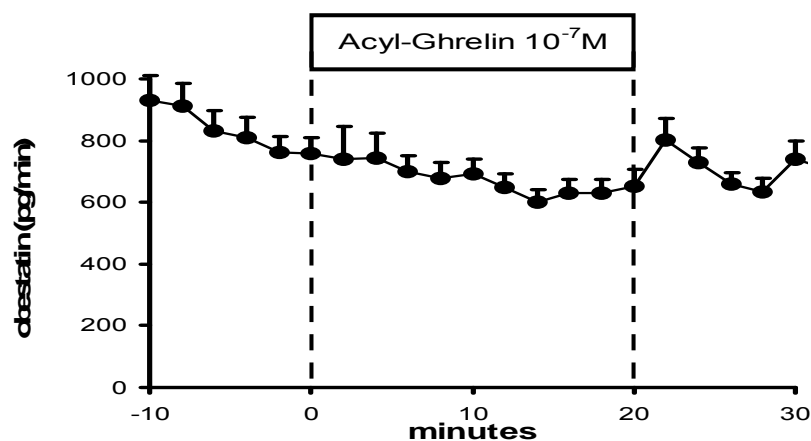


Abbildung 28: Graphische Darstellung der Veränderung der Obestatinsekretion bei einer Infusion von Acyl-Ghrelin in einer Konzentration von $10^{-7}M$ ($n=7$) über einen Zeitraum von 20 Minuten, sowie einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $pg/min \pm SEM$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

3.3.2.2. Effekt von Desacyl-Ghrelin auf die Obestatinsekretion

Die Infusion von Desacyl-Ghrelin hatte in den Konzentrationen $10^{-9}M$ und $10^{-7}M$ keinen signifikanten Effekt auf die Obestatinfreisetzung. Es ergaben sich rechnerisch Differenzen von $0,6 \pm 1,4 pg/ 15 min$ ($n=6, p>0,05$) und $0,3 \pm 0,959 pg/ 15 min$ ($n=6, p>0,05$) für die jeweils oben genannten Konzentrationen.

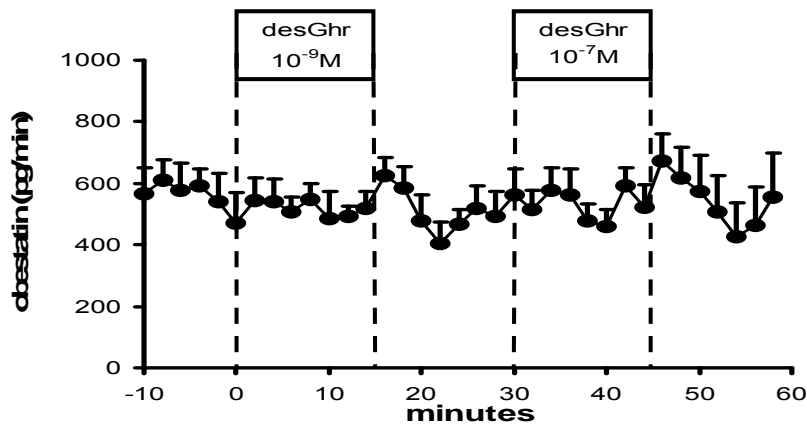
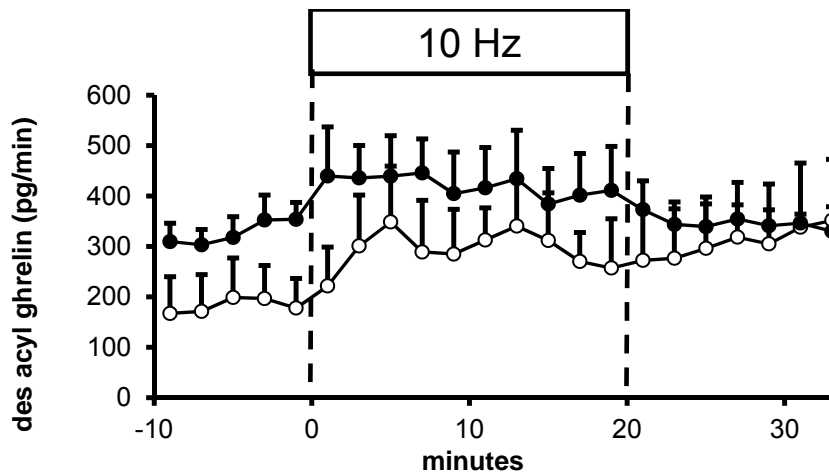


Abbildung 29: Graphische Darstellung der Veränderung der Obestatinsekretion bei einer Infusion von Desacyl-Ghrelin in einer Konzentration von $10^{-9}M$ ($n=6$) und $10^{-7}M$ ($n=6$) über einen Zeitraum von 15 Minuten und einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $pg/min \pm SEM$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

3.5. Auswirkungen von Alter und Gewicht der Ratten

In diesem Versuchsablauf wurde die vagusinduzierte Desacyl-Ghrelinsekretion bei älteren und gleichzeitig schwereren Ratten mit der bei leichtergewichtigen jüngeren Tieren verglichen. Es ergab sich eine Differenz von 334 ± 179 pg/ 20 min (dicke Ratten n=3, dünne Ratten n=5, $p > 0,05$).



Dicke Ratten •, Dünne Ratten ◦

Abbildung 30: Graphische Darstellung der Veränderung der Desacyl-Ghrelinsekretion bei einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 20 Minuten und einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

4. Allgemeine Diskussion

4.1. Struktur von Obestatin

Zhang und Mitarbeiter entdeckten 2005 erstmals ein Peptidhormon, welches aus dem Vorläuferpeptid Präproghrelin abstammt (18).

Aus diesem entsteht zum einen Ghrelin, welches aus 28 Aminosäuren zusammengesetzt ist und an der dritten Stelle der Aminosäuresequenz mit einer Veresterung der Hydroxylgruppe des Serins mit der Carboxylgruppe der Oktansäure verbunden ist (19). Zum anderen stammt daraus auch das aus 23 Aminosäuren bestehende Peptidhormon Obestatin.

Bei Obestatin handelt es sich um ein aus 23 Aminosäuresequenzen bestehendes Peptidhormon, welches durch Amidierung am C-Terminus biologisch aktiviert wird.

Die Forscher sagten diesem Hormon initial eine anorexigene Wirkung nach und nannten es dem lateinischen Begriff nach zu Folge "obedere," und "statin," , übersetzt als Übergewicht supprimierend (13).

4.2. Vorkommen und Lokalisation von Obestatin

Von Interesse ist es das Vorkommen und die Syntheseorte des Obestatins zu identifizieren, um daraus die Interaktion und die Wirkweise auf die Peripherie wie auch auf das zentrale Nervensystem besser verstehen zu können.

Durch die Herstellung eines Antiserums, war es der Forschergruppe um Dun et al. möglich, eine Immunreaktivität (irOBS) in Zellen nachzuweisen, die Obestatin sezernieren (20).

So konnte eine irOBS-Expression sowohl im Gastrointestinaltrakt als auch im Hoden männlicher Ratten nachgewiesen werden.

Im Magen-Darm-Trakt scheint vor allem die gastrointestinale Mucosa ein Produktionsort für das Obestatin zu sein. So fand sich im Magen eine größere Immunreaktivität als im Duodenum, sowie in den basalen Anteilen der Glandularzellen eine höhere Aktivität als in den distalen Anteilen.

Daneben sezernieren auch die Ganglienzellen des Plexus myentericus Obestatin in unterschiedlicher Intensität. Folglich konnte eine Immunreaktivität in den Granula-like Vesikeln, im Zytoplasma, nicht aber in den Nuclei des Plexus entdeckt werden. Interessanterweise zeigten die Ganglienzellen des Plexus myentericus auch eine

Immunreaktivität auf das Vorläuferpeptid Präproghrelin (irGRL). Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass aufgrund der gleichzeitigen Existenz des Präproghrelins, diese Zellen sowohl Obestatin als auch Ghrelin sezernieren können. Bekräftigt wird diese These durch die Erkenntnis, dass fast alle irOBS-Zellen des Plexus myentericus der Ratte ChAT (cholin acetyltransferase) positiv sind und damit das Vorkommen von Obestatin auch in cholinergen Neuronen nachgewiesen werden kann. Gleichzeitig lässt das Wissen über die Co-Existenz der Ghrelin-Immunreaktivität und des ChAT die Vermutung aufkommen, dass die cholinergen Neurone im Plexus myentericus sowohl Ghrelin als auch Obestatin enthalten.

Interessant ist, dass zwei Peptide, welche vom gleichen Vorläuferpeptid abstammen und zum Teil von den gleichen Zelle exprimiert werden, eine so gegensätzliche Wirkung auf den Organismus ausüben können.

Barreiro et al. entdeckte überdies auch die gleichzeitige Expression von Ghrelin und Obestatin in den Leydig-Zellen des Hodens männlicher Ratten (21).

Eine neuronale Aktivität des Obestatin konnte durch die Veränderung der intrazellulären Calcium-Konzentrationen aufgezeigt werden. So bewirkt eine Aktivierung von Obestatin-Rezeptoren einen signifikanten Anstieg des intrazellulären Calcium-Gehaltes in kortikalen Neuronen. Dies wird zum einen durch eine vermehrte Freisetzung von Calcium aus internen Speichern und zum anderen durch den verstärkten Einstrom über die plasmalemalen Calciumkanäle erreicht. So finden eine Reihe von neuronalen Aktivitäten Anschluss an eine konsekutive Veränderung des Calcium-Spiegels, wie z.B. die synaptische Transmission, das Zellwachstum, die Apoptose sowie die neuritische Retraktion (22, 23).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Obestatin in der gastralen Mucosa, im Plexus myentericus und in den Leydig-Zellen exprimiert wird und dass dieses Peptid eine biologische Aktivität in neuronalen Zellen besitzt.

4.3. Spezielle Wirkung auf das Verdauungssystem

Zhang et al. berichteten erstmals 2005 über die Wirkung des Obestatin. Sie entdeckten, dass es bei peripherer Verabreichung die tägliche Nahrungsaufnahme vermindert, die Magenentleerung verzögert, das Körpergewicht reduziert und eine antagonistische Wirkung auf das Ghrelin ausübt.

Viele Arbeitsgruppen machten es sich zur Aufgabe diese Behauptungen zu bestätigen, indem sie Ratten und Mäusen sowohl peripher als auch zentral Obestatin verabreichten. Erstaunlicherweise gelang es vielen nicht die beschriebene Wirkung nachzuweisen. So konnten Nouguras et al. weder einen signifikanten Effekt des Obestatin auf die Nahrungsaufnahme, noch auf den BMI aufzeigen (24).

Auch bei gleichzeitiger Verabreichung mit Ghrelin, konnte weder eine antagonistische Wirkungsweise noch ein signifikanter Effekt auf den Energie-Haushalt nachgewiesen werden. Der Grund für diese Diskrepanzen ist bis heute unklar.

Dem zu Folge kamen Smet et al. zu dem Entschluss, dass dem Obestatin in der Regulation der gastral Motilität keine bedeutende Rolle zugeschrieben werden kann, denn es zeigte sich weder *in vitro* eine Zunahme der Kontraktionsfähigkeit jejunaler Muskelstreifen, noch kam es *in vivo* zu einer Beeinflussung der gastral Entleerungsparameter (T half, T lag) (25).

Der Grund dafür könnte womöglich auch darin liegen, dass die Wirkung des Obestatin durch seinen Gegenspieler Ghrelin aufgehoben wird und darüber hinaus dessen Halbwertszeit im Organismus zu kurz ist, um eine signifikante Wirkung auf die gastrointestinale Funktion auszuüben.

Bresciani bestätigte zwar eine nahrungshemmende Wirkung des Obestatin, sah aber keinen Einfluss auf die GH- und die Corticosteroid-Sekretion (26).

Die Vielzahl an kontroversen Ergebnissen erschwert eine eindeutige Formulierung der Wirkweise des Obestatin auf den menschlichen und tierischen Organismus. Doch das Wissen über die Abstammung vom gleichen Vorläuferpeptid wie Ghrelin und die Erkenntnis über Lokalisation und Vorkommen des Obestatin legen die Vermutung über eine Beteiligung am gastrointestinalen Regulationsmechanismus nahe, ob nun orexigen oder anorektisch.

4.4. Wirkung auf bestimmte Organsysteme

4.4.1. Das Auge

Bei einem gesunden Auge verarbeitet das retinale Pigmentepithel die abgestoßenen Scheibchen der Rezeptoren und schirmt das einfallende Licht nach hinten ab. Dabei herrscht eine Balance zwischen Proliferation und Wachstumshemmung des retinalen Pigmentepithels. Unter pathologischen Bedingungen interagieren eine Vielzahl von Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie z.B. PDGF (27), TNF α (28), IL 8 und MCP-1 (29) miteinander und lösen bei Aktivierung eine Signalkaskade aus, die zu einer ungehemmten Proliferation und Emigration der retinalen Pigmentepithelzellen führen. Folglich wandern diese in den Glaskörper ein und führen zu einer proliferativen Vitreoretinopathie (PVR) mit konsekutiver Netzhautablösung und Visusverlust.

Die Forschergruppe um Camiña et al. entdeckte erstmals, dass das Peptidhormon Obestatin wahrscheinlich auch einen Beitrag an der Entstehung der PVR leistet. Sie konnten zeigen, dass Obestatin dosisabhängig über ein PTX-sensitives Gi-Protein eine Signalkaskade aktiviert, die das MEK/ERK1/2 phosphoryliert und somit eine Zellproliferation induziert (30). Dies lässt erkennen, dass Obestatin die Hyperplasie des Pigmentepithels fördert und somit auch eine Rolle an der Erkrankung der Retina spielt.

Des Weiteren fand man heraus, dass bei übergewichtigen Menschen die proliferative diabetische Retinopathie die erste Organmanifestation eines Diabetes mellitus darstellt, was sich womöglich auf die im Rahmen einer Gewichtszunahme entstehenden Veränderungen des Obestatinpiegels zurückführen lässt (30).

4.4.2. Die Ovarien

Bekanntermaßen wird Obestatin nicht nur im Gastrointestinaltrakt sezerniert, sondern auch in den Leydig-Zellen des Hodens. Einen Effekt auf die Reproduktionsorgane konnte noch nicht aufgezeigt werden, aus diesem Grund untersuchte die Forschergruppe um Mészárosová die Auswirkungen des Obestatin auf porcine Ovarien. Sie kamen zu der Erkenntnis, dass Obestatin die Expression einer Vielzahl von Proliferationsmarkern (PCNA peptid, cyclin B1,

Map-Kinase) stimuliert, die wiederum den Übergang in die mitotische Phase des Zellzyklus fördern (31). Dies lässt vermuten, dass Obestatin durch die Beeinflussung des Zellzyklus die Proliferation porciner Granulosazellen in den Ovarien aktiviert.

Ferner wird eine Beteiligung in der Apoptose postuliert, denn Obestatin fördert auch die Expression apoptotischer Peptide, wie z.B. das Bax, die Caspase 3, sowie das anti-proinflammatorische Peptid p53 in Zellen der Ovarien.

Die contemporäre Stimulation von Proliferation und Apoptose führen zu der Annahme, dass Obestatin einen Einfluss auf das Turnover/bzw. das Remodelling in ovariellen Zellen hat.

Die Forschergruppe deklarierte zudem eine Obestatin induzierte Stimulation der P4-Sekretion. Dabei handelt es sich um ein Steroidhormon, welches vom Corpus luteum sezerniert wird und die Luteinisation ovarieller Follikelzellen aktiviert.

Interessanterweise wirkt das Ghrelin auf ähnliche Weise, so stimuliert es die Proliferation, die Apoptose und die Steroidsynthese in Ovarien von Hühnern (32).

Eine Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt einen direkten Einfluss des Obestatin auf die ovarielle Zellfunktion erkennen und damit auch die Vermutung aufkommen, dass eine mögliche Interaktion zwischen intrakorporalen Metabolismus, Ernährungsstatus und Reproduktionsmechanismus besteht.

4.4.3. Das Zentrale Nervensystem

Obestatin scheint auch auf die Gedächtnisleistung und die Psyche einen Einfluss zu nehmen. Carlini et al. fanden erstmals heraus, dass dieses Peptidhormon bei Ratten die Speicherkapazität des Gedächtnisses erhöht und eine anxiolytische Wirkung zur Folge hat (33).

So zeigten sie, dass Ratten denen Obestatin i.c.v. verabreicht wurde, weniger ängstlich waren als die Vergleichsgruppe, sie tolerierten es länger auf einem freien Balken zu stehen und betraten diesen auch öfter. Der dafür verantwortliche Bereich im zentralen Nervensystem scheint sowohl der Hippocampus als auch die Amygdala zu sein. Ob nun das Obestatin über die dort gefundenen GPR-39 Rezeptoren wirkt oder über einen anderen Mechanismus ist unklar.

Betrachtet man nun den postulierten Gegenspieler des Obestatin, so konnte gezeigt werden, dass Ghrelin nach Injektion in den Hippocampus und der Amygdala eine Anxiogenese hervorruft (34).

Interessanterweise nimmt bei i.c.v. Gabe von Obestatin auch die Gedächtnisfähigkeit bei Ratten zu. Es liegt in der Natur der Ratte ein erhöhtes Interesse für unbekannte Artgenossen aufzuzeigen. Nach einer intracerebralen Injektion wurde beobachtet, dass das Erinnerungsvermögen der Tiere gesteigert wurde, da sie bereits bekannte Tiere ignorierten und sich verstärkt mit unbekanntem Artgenossen beschäftigten. Auch dieser Effekt wird vornehmlich durch den Hippocampus und die Amygdala gesteuert. Im Gegensatz zum Angstverhalten wirkt Ghrelin bezüglich der Gedächtnisleistung ähnlich wie die oben beschriebene Wirkung des Obestatin.

Des Weiteren erkannten die Forscher auch eine Obestatin- induzierte Fressinhibition bei Ratten, denen das Hormon i.c.v. verabreicht worden war. Interessanterweise kann auch hier davon ausgegangen werden, dass Obestatin zentral nicht über den Hypothalamus, dem klassischen Fresszentrum, wirkt, sondern vielmehr über den Hippocampus und die Amygdala.

Zusammenfassend wirkt Obestatin anxiolytisch, gedächtnisfördernd und hemmend auf das Fressverhalten.

4.4.4. Der Schlafrhythmus und das Trinkverhalten

Nach intracerebroventrikulärer Gabe wirkt das Obestatin nicht nur anxiolytisch und gedächtnissteigernd, sondern fernerhin auch direkt auf den Schlaf-Wach-Rhythmus (35, 36).

Eine Stunde nach i.c.v. Injektion konnte bei den Versuchstieren (Ratten) eine signifikante Zunahme der NREM-Schlafphase um 58% sowie eine Verminderung der Schlaf-Latenz und der slow-waves Aktivität im EEG erkannt werden. Erstaunlicherweise sanken nach zwei Stunden post injectionem die NREM-Schlafphasen wieder, wobei nun auch eine Abnahme der REM-Schlafperioden zu beobachten war. Diese Tatsache ist wahrscheinlich auf einen homöostatischen Kompensationsmechanismus zurückzuführen.

Interessant ist, dass nach zwei Stunden Obestatin die gleiche Wirkung auf den Schlaf- Wach-Rhythmus ausübt wie Ghrelin, welches intracerebroventrikulär verabreicht auch zu einer Verminderung des NREM- und des REM-Schlafes führt.

Fernerhin verursacht Ghrelin auch das dark-onset-Syndrom, welches mit einer vermehrten Nahrungsaufnahme, einer erhöhten Wachheit und einer gesteigerten motorischen Aktivität einhergeht.

Einige Forscher stellten die These auf, dass eine durch Obestatin induzierte verminderte Nahrungsaufnahme sekundär die Folge eines verminderten Trinkverhaltens sein könnte (37). Sie entdeckten, dass Ratten, denen Obestatin i.c.v. verabreicht wurde, ihre Wasseraufnahme drosselten. Außerdem inhibiert das Peptidhormon die Angiotensin II-vermittelte Wasseraufnahme, wobei dieser Mechanismus durch Beeinflussung der Nebenniere induziert wird und nicht durch Beeinflussung der Hypophyse. Denn es konnte gezeigt werden, dass Obestatin weder bei i.c.v.- noch bei i.v.- Injektion in der Lage war die Ausschüttung von Wachstumshormonen zu steigern.

Abschließend kann man sagen, dass Obestatin durch Suppression des Trinkverhaltens, durch Verminderung der *in vivo* GH-Sekretion (38), durch Schlafregulation, durch Aktivierung neuronaler Hormone (20) und durch Stimulation retinaler Pigmentepithelzellen, als aktives Peptid fungiert. Dennoch bleibt seine Funktion noch unbekannt und muss näher hinterfragt werden.

4.4.5. Das Magenkarzinom

Es konnte gezeigt werden, dass Obestatin durch ein PTX-sensitives G-Protein die PKC (Protein-Kinase C) Isoenzyme aktiviert, die wiederum durch eine ERK1/2-Phosphorylierung die Proliferation der Magenkarzinomzelllinie (KATO-III) stimuliert. Die Aktivierung der KATO III-Zellen durch Obestatin führte zu einer signifikanten Zellproliferation, was durch das Ghrelin nicht ausgelöst werden konnte (39).

4.4.6. Das Pankreas

Obestatin wird ähnlich wie Ghrelin in ϵ -Zellen des fetalen und adulten Pankreasgewebe produziert und fungiert damit auch als ein lokaler Regulator der Beta-Zellfunktion.

Granata et al. konnte zeigen, dass Obestatin die Synthese der Beta-Zellen und der Insel-Zellen des Pankreasgewebe fördert und sogar deren Apoptose verhindert, indem es die Aktivität der Caspase 3 reduziert (40).

Ähnliches postulierte auch Egido et al., der ebenfalls einen Einfluss des Obestatins auf die Beta-Zellsekretion und einer damit verbundenen Glukose-induzierten Insulinsekretion sah (41). Man fand eine positive Korrelation der Immunreaktivität von Obestatin mit der Insulinsekretion (42).

Dennoch wird der Effekt des Obestatin auf die Insulinsekretion kontrovers diskutiert. So zeigte Green et al., dass bei Mäusen, denen Obestatin intraperitoneal verabreicht wurde, keine Veränderung der Glukose oder Insulinkonzentrationen zu verzeichnen waren (14).

Zusammenfassend ist die Wirkung auf das endokrine Pankreas immer noch weitestgehend unbekannt.

5. Spezielle Diskussion

5.1. Auswirkungen des Nervus vagus auf die Ghrelin- und Obestatinsekretion

Viele Studien sehen den Nervus vagus als Verbindungslinie zwischen dem Verdauungstrakt und dem zentralen Nervensystem an. So entstehen durch afferente und efferente Nervenfasern Interaktionen zwischen dem Magen-Darm-Trakt und dem ZNS, die eine gegenseitige Informationsübertragung über die aktuelle Nahrungsaufnahme, den Nahrungsgehalt und den Energieverbrauch ermöglichen.

Direkte und indirekte Interaktionen zwischen dem Nervus vagus und der Ghrelinsekretion konnten bereits in einigen Studien aufgezeigt werden. So führt eine elektrische Stimulation des Nervus vagus am isolierten Rattenmagenmodell unabhängig vom intraluminalen pH und der Stimulationsfrequenz zu einer signifikanten Steigerung der Ghrelinsekretion. Auch die Ergebnisse von William et al. zeigen, dass eine subdiaphragmale Vagotomie einen Anstieg von Ghrelin bei hungernden Ratten verhindert (43).

Diese stimulierende Wirkung lässt sich lediglich in *in vitro* Versuchen beobachten, denn *in vivo* Experimente ergaben einen inhibitorischen Effekt. Lee und Mitarbeiter kamen zu dem Ergebnis, dass nach Ausschalten der vagalen Wirkung im Rahmen einer Vagotomie eine dreifache Erhöhung der Ghrelinsekretion zu beobachten war (44).

Diese inhibitorisch-tonische Funktion des Nervus vagus auf Ghrelin ist wahrscheinlich Ausdruck komplexer Regulationsmechanismen, die am isolierten Rattenmodell ausgeschaltet sind. Nichtsdestotrotz zeigen viele Studien, dass der Nervus vagus *in vivo* von Nöten ist, um eine Ghrelin-induzierte Steigerung des Fressverhaltens hervorzurufen (45, 46).

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass beim isolierten Organ die elektrische Reizung des Nervus vagus zu einer signifikanten Steigerung der Acyl-/ Desacyl-/ und Total-Ghrelinsekretion führte.

Die gleichzeitige Abstammung vom Präproghrelin lässt die Vermutung aufkommen, dass Obestatin ebenfalls durch Beeinflussung der Aktivität vagaler Afferenzen, Einfluss auf die gastral-zepmale Sättigungskaskade nehmen kann.

Die Forschergruppe um Zhang et al. kam zu der Erkenntnis, dass eine *in vitro* Gabe von Obestatin die jejunale Kontraktionsaktivität vermindert, was wiederum *in vivo* afferente Vagusfasern stimulieren könnte, die über neuronale Bahnen ein zentrales Sättigungssignal im ZNS hervorrufen (13). Somit kann die These aufgestellt werden, dass Obestatin indirekt über den Nervus vagus auf die Energie-Homöostase wirken könnte.

Im Gegensatz dazu beschreiben Glourcerol et al., dass bei einem isolierten Organmodell die i.a. Injektion von Obestatin keine Aktivierung afferenter vagaler Fasern (GVA) zur Folge hat, wohingegen CCK einen Aktivitätsanstieg von 189% zu verweisen hat (47).

Auch die vorliegenden Daten am isolierten Organmodell konnten keine synergistische Interaktion zwischen Obestatin und dem Nervus vagus feststellen. Eine 20-minütige Aktivierung des Nervus vagus mit 10 Hz führte zu keiner Veränderung der Obestatinsekretion. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung aufkommen, dass die anorektische Wirkung des Obestatin nicht auf die vagal induzierte Aktivierung der Sättigungskaskade zurückzuführen ist.

Anders als beim Magen-Darm-Trakt scheint jedoch ein intakter Nervus vagus notwendig zu sein, um die durch das Obestatin getriggerte Pankreasenzym-Freisetzung zu stimulieren. So konnte in Versuchen bei Ratten aufgezeigt werden, dass bei Zustand nach subdiaphragmaler Vagotomie eine verminderte Sekretion der Pankreasenzyme zu beobachten war (48).

Zusammenfassend zeigt sich, dass nicht von einer direkten Interaktion des Obestatin und des Nervus vagus im Hinblick auf die gastrale Sättigungskaskade ausgegangen werden kann, Auswirkungen auf andere Organsysteme aber durchaus bestehen.

5.2. Auswirkungen von Adiponektin auf die Ghrelinsekretion

Das Fettgewebe dient nicht nur als Energiereservoir, sondern kann auch als endokrin aktives Organ angesehen werden. So sezernieren Adipozyten eine Reihe von Proteinen, wie z.B. Resistin, Leptin und Adiponektin, die eine wichtige Rolle in der Entstehung der Adipositas und ihrer Folgeerkrankungen spielen.

Forscher entdeckten ein aus 244 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon Adiponektin, welches der Entstehung von Krankheiten, wie z.B. Diabetes mellitus Typ II, Artherosklerose sowie einer NASH entgegenwirkt.

Interessanterweise korreliert Adiponektin im Gegensatz zu anderen Adipocytokinen, die in einer Adipositas hochreguliert sind, negativ mit dem BMI, mit der Körperfettmasse und mit der nüchtern Insulin- sowie Triglycerid-Konzentration. Rhesus Affen, die ein Übergewicht und konsekutiv einen Diabetes mellitus entwickelten, wiesen erniedrigte Adiponektin Konzentrationen auf (49, 50).

Das Hauptaugenmerk der Forscher liegt auf dem hypoglykämischen Effekt, der weniger auf eine erhöhte Insulinsekretion zurückzuführen ist als vielmehr auf eine Adiponektin-induzierte Erhöhung der Insulinsensitivität (51). So führt eine Hypoadiponektinämie bei jungen Menschen durch eine β -Zell-Dysfunktion zu einer Insulin-Resistenz und damit letztendlich zu der Entstehung eines Diabetes mellitus (52).

Auch eine viszeral betonte Adipositas und eine Verminderung des HDL sind bei einem verminderten Adiponektin-Spiegel zu beobachten (53, 54).

Verschiedene Arbeiten schrieben dem Peptidhormon eine antiinflammatorische Eigenschaft zu, die der Entstehung einer Artherosklerose entgegenwirkt. So ist es nicht verwunderlich, dass Patienten mit einem metabolischen Syndrom oftmals erniedrigte Werte dieses Hormons aufweisen.

Sowohl Adiponektin als auch Ghrelin sind involviert in der Regulation der körperlichen Energie-Homöostase. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung der adipositas-assoziierten Insulin-Resistenz bei Typ 2 Diabetikern.

Verschiedene Studien offenbarten, dass Adiponektin negativ mit Desacyl- und Acyl-Ghrelin korreliert (55). Zudem supprimiert Ghrelin die Adiponektin-Expression um fast 50% (56). Diese entgegengesetzte Beeinflussung der beiden Hormone, lässt sich mit der unterschiedlichen Wirkweise auf den Energiehaushalt begründen. So fördert Ghrelin die Glucose-Oxidation sowie die Lipogenesis und im Gegensatz dazu steigert Adiponektin die Gluconeogenese, die β -Oxidation sowie die TAG-Clearance (57).

Des Weiteren stimulieren Insulin und IGF-1 die Adiponektinsekretion (51), wohingegen sie die Ghrelin-Sekretion hemmen, so kann ein inhibitorischer Effekt zwischen Ghrelin und dem IGF-1 beobachtet werden (58).

Es besteht ein großes Interesse der Forscher darin einen direkt hemmenden Effekt des Adiponektin auf das hungerfördernde Ghrelin aufzuzeigen, um damit eventuell der Entstehung der Adipositas entgegenzuwirken. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *in vitro* bei Vagus induzierter Stimulation der Total-Ghrelinsekretion, die Applikation von Adiponektin eine signifikante Reduktion der Ghrelinkonzentration zur Folge hatte. Somit ist die negative Korrelation zwischen den beiden Hormonen nicht nur indirekt durch die Insulinwirkung hervorgerufen, sondern wie hier gezeigt werden konnte, auch durch eine direkte Wechselwirkung.

Somit lässt sich die Hypothese aufstellen, dass womöglich auch bei *in vivo* Versuchen die Verabreichung von Adiponektin eine Verminderung der körpereigenen Ghrelinausscheidung zur Folge haben könnte. Hierzu sind noch weitere *in vivo* Studien notwendig.

5.3. Auswirkungen von Resistin auf die Ghrelinsekretion

Resistin ist ein Peptidhormon, welches von Adipozyten sezerniert wird. Auch bekannt unter dem Namen serine/cysteine rich adipocyte specific secretory factor (ADSF) oder FIZZ3, besteht es aus 108 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 11,3 kDa.

Steppan et al. entdeckte es erstmals 2001. Nachdem er es Mäusen verabreichte und eine darauffolgende Insulin-Resistenz beobachtete, gab er diesem Peptid seiner Wirkung nach zufolge „resistance to insuline“ den Namen Resistin (59). Des Weiteren stellte man fest, dass Rosiglitazone die Insulin-Sensitivität erhöhen und die Expression von Resistin supprimieren (60). In den darauf folgenden Jahren beschäftigten sich viele Arbeitsgruppen mit dessen Wirkung auf den menschlichen Organismus.

Resistin stimuliert in Adipozyten die Lipolyse und die Expression von VCAM1 und von ICAM1, was in der Pathogenese der Arteriosklerose eine wichtige Rolle spielt (61). Erhöhte Konzentrationen von Resistin waren auch verbunden mit dem gesteigerten Auftreten von plötzlichem Herzversagen (62).

Ferner wurde eine Assoziation mit der Adipositas und mit der Entstehung von Diabetes mellitus Typ II postuliert (63, 64, 65). Viele Arbeiten beschreiben im Fettgewebe, in der Skelettmuskulatur und in der Leber eine positive Korrelation der Resistinkonzentration mit einer Insulinresistenz. So führte die Gabe von Resistin zu einer Verminderung der Tyrosin-Phosphorylierung des Insulinrezeptors um ca. 40%, was letztlich eine Insulinresistenz zur Folge hatte (66).

Es konnte gezeigt werden, dass durch Stimulation der Expression proinflammatorischer Zytokine (67,63) die Insulin-Sensitivität durch Blockierung der Insulin-Wirkkaskade reduziert und damit die Entstehung einer Insulin-Resistenz gefördert wird (68).

Darüber hinaus fand man heraus, dass Resistin die intrahepatische Glucoseproduktion erhöht, indem es die Glucose-6-Phosphatase, die Phosphoenolpyruvate-carboxykinase (PEPCK), und den Suppressor des Cytokine -Signal 3 (SOCS-3) stimuliert (69).

Letztlich besteht die Hauptwirkung des Resistin indirekt durch Induktion einer Insulinresistenz. So führte die Perfusion eines isolierten Rattenmagens mit Insulin zu einer signifikanten Erniedrigung des Ghrelinspiegels (70). Theoretisch wäre es also durchaus denkbar, dass Resistin aufgrund seiner inhibitorischen Effekte auf die Insulinwirkung, einen stimulierenden Effekt auf die Ghrelinfreisetzung haben könnte. Dies muss allerdings erst in weiteren Studien gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass weder die Konzentration 10^{-10}M noch 10^{-8}M einen signifikanten Effekt auf die Desacyl-/ Acyl-Ghrelinsekretion erzielte. So dass davon auszugehen ist, dass Resistin *in vitro* keinen stimulierenden Effekt besitzt und der Effekt erst über Insulin vermittelt wird.

Daher kann man abschließend sagen, dass sowohl Resistin als auch Ghrelin eine entscheidende Rolle in der Entstehung der Adipositas und deren Folgeerkrankungen haben, aber eine direkte Wechselwirkung nicht nachgewiesen werden konnte.

5.4. Auswirkungen von Apelin auf die Ghrelinsekretion

Apelin wurde erstmals aus dem Rindermagen exprimiert, basierend auf seiner Fähigkeit die extrazelluläre Azidifikationsrate zu erhöhen und die cAMP Produktion in chinesischen Hamsterovarien zu erniedrigen, nachdem diese mit einem APJ-Rezeptor versehen wurden (71, 72).

Apelin-36 besteht aus 36 Aminosäuren und wird in vielen Regionen des Körpers exprimiert. So konnte es z.B. im Gastrointestinaltrakt, im Herzen, im Gefäßsystem, in der Skelettmuskulatur, in der Niere, im Gehirn, in der Lunge, in der stillenden Mamma sowie im weißen Fettgewebe nachgewiesen werden (73, 74). Aufgrund dieser Erkenntnis beschäftigen sich viele Arbeitsgruppen mit der Wirkweise des Apelins auf die jeweiligen Organsysteme.

Es hat Einfluss auf das Herz-Kreislauf-System (75, 76), indem es den arteriellen Blutdruck senkt, positiv inotrop wirkt und fernerhin beim Entstehen von kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt ist (77).

Überdies wurde auch eine Steigerung des Trinkverhaltens bei Ratten beobachtet (72). Auf das nephrologische System wirkt es durch Hemmung des Angiotensin II diuretisch, was letztendlich auch zu einer Gewichtsreduktion führen kann.

Interessanterweise wirkt es auch als Cofaktor im Prozess der HIV-Infektion (78, 79, 80), wobei zwischen dem kürzeren und dem längeren Peptid differenziert werden muss (Apelin 13 und 16). So verhindert das längere Peptid sogar den Eintritt des HI-Virus in die menschliche Zelle (81), wohingegen das kürzere Apelin 13 vor allem Einfluss auf das Herz-Kreislaufsystem nimmt (82).

Der Hauptexpressionsort des Apelin ist der Magenfundus, so wurde es in den mucosalen Neben-, Haupt- und Becher-Zellen entdeckt, aber auch im Kolon, Ileum und Duodenum konnte es nachgewiesen werden.

Studien zeigen, dass Apelin und Chromogranin A, ein Marker endokriner Zellen (83), in gastralen Epithelzellen coexistieren. Dies führt zu der Annahme, dass Apelin auch eine endokrine Funktion im Magen ausüben könnte. Darüber hinaus konnte mittels Immunhistochemie das Vorliegen von Apelin in glandulären Epithelzellen des menschlichen und tierischen Magens belegt werden (84). Somit erfüllt es sowohl endokrine als auch exokrine Funktionen.

Aufgrund der Expression des Apelins in Organsystemen, die in der Sättigungskaskade involviert sind, legt die Hypothese nahe, dass dieses Peptid Auswirkungen auf die Nahrungsaufnahme und vielleicht sogar einen direkten Effekt auf die Ghrelinsekretion haben könnte.

Bei intraperitonealer Zufuhr von Apelin kam es bei adipösen Menschen zu einer Reduktion des Körpergewichts bzw. konnte eine Gewichtszunahme verhindert werden (85).

Dieser Effekt beruht auf eine durch das Apelin getriggerte Expression bestimmter Proteine (UCPs 1), welche Auswirkungen auf die Adipositas und den Energie-Metabolismus haben (85). Darüber hinaus kommt es zu einer Senkung des plasmatischen Insulin- und Leptin-Spiegels, was ein weiterer Cofaktor in der Reduktion des Übergewichts darstellt. Eine Veränderung der Nahrungsaufnahme per se konnte aber nicht gezeigt werden (85).

Eine intracerebroventriculäre Gabe von Apelin-13 hingegen führte zu einer verminderten Nahrungsaufnahme bei fressenden Ratten, nicht jedoch bei fastenden Tieren. Im Gegensatz dazu führte eine kontinuierliche Administration von Apelin-12 zu einer Fress-Stimulation (86).

Reaux et al. entdeckten Apelin-Neurone im Nucleus supraopticus und Nucleus paraventriculare, beides Strukturen, die als Sättigungszentrum fungieren (72). Diese steigern durch die Ausschüttung von TRH und CRH den intrakorporalen Energieverbrauch, indem sie verstärkt Schilddrüsenhormone sezernieren. Durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems vermindern sie die Nahrungsaufnahme und rufen damit konsekutiv eine Gewichtsreduktion hervor.

Eine direkte Assoziation zwischen Ghrelin und Apelin konnte bis jetzt nur durch die gleichen Expressionsorte vermutet werden. So wurde in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen durch Zugabe eines Apelin-Gemisches, eine vagusstimulierte Ghrelinsekretion zu beeinflussen. Weder die Apelin Konzentrationen 10^{-10} M noch 10^{-8} M veränderten die Desacyl-Ghrelin Ausschüttung signifikant.

Durch diese Erkenntnisse ist davon auszugehen, dass Apelin eher durch eine zerebrogastrale Verschaltung seine Wirkung auf die Energiehomöostase entfaltet, als durch eine direkte Interaktion mit dem gastral sezernierten Ghrelin.

5.5. Auswirkungen von Obestatin auf die Ghrelinsekretion

Obestatin ist ein 23 Aminosäurepeptid, welches aus dem Rattenmagen sezerniert wurde. Es entsteht aus dem gleichen Vorläuferpeptid wie Ghrelin. Wie bereits erwähnt, wird diesem Peptidhormon nachgesagt, dass es die tägliche Nahrungsaufnahme vermindert, die Magenentleerung verzögert, das Körpergewicht reduziert und als Gegenspieler zum Ghrelin fungiert (13). Daraus resultiert die These, dass es sich bei Obestatin, um den direkten Antagonisten des Ghrelin handeln muss, da alle von Zhang beschriebenen Effekte sich konträr zu der Wirkung von Ghrelin verhalten.

So zeigte Lagaud, dass eine intraperitoneale Verabreichung von Obestatin eine anorektische Wirkung nach sich zog und eine Ghrelingabe orexigen wirkte. Als beide Hormone jedoch gemeinsam verabreicht wurden, änderte sich das Fressverhalten der Ratten und Mäuse nicht. Somit wurde eine antagonistische Interaktion postuliert (87, 13, 38).

Im Gegensatz zu den oben genannten Studien behaupten viele Arbeitsgruppen, dass Obestatin alleine oder in Kombination mit CCK keinen Effekt auf die Nahrungsaufnahme hat und auch die gastrale Entleerung nicht beschleunigt (88, 89). Weder *in vivo* noch *in vitro* verabreichtes Obestatin ergaben eine Wirkung auf die Energie-Homöostase (88, 89).

Bassil hingegen entdeckte, dass Obestatin die Fähigkeit des Ghrelins, nämlich die EFS-evozierte Kontraktion des Magens zu erleichtern, reduzierte. Darüber hinaus schienen größere Obestatinkonzentrationen (10-1000 nM) die Ghrelinsensitivität zu verringern, jedoch konnte weder eine signifikante Veränderung, noch eine Hemmung der jejunalen sowie der Forestomach Kontraktion beobachtet werden (89).

Eine signifikante Erhöhung der GH-Sekretion konnte für das Ghrelin, wie auch für seinen Rezeptor, GHRH- oder GHRP-2, bei intravenöser Administration gezeigt werden. Obestatin hingegen konnte auch diesen Effekt nicht antagonisieren. So kam es bei intrazerebroventrikulärer Gabe zu keinerlei Veränderung in der Sekretion hypophysärer Hormone wie GH, PRL, ACTH und TSH (90, 26).

Letztlich bleibt es fraglich, ob es sich bei Obestatin um den direkten Gegenspieler des Ghrelins handelt. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind zum Teil damit erklärbar, dass bei der Originalarbeit von Zhang et al. ein nicht purifiziertes Obestatin verwendet worden war. Schließlich war es der gleichen Arbeitsgruppe in einer späteren Untersuchung, nach Verwendung eines reinen Obestatin, nicht mehr möglich ihre anfänglichen Ergebnisse zu reproduzieren (91).

Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte in den verwendeten Obestatinkonzentrationen liegen. Denn weder sehr hohe noch sehr niedrige Dosen hatten bei i.p. Gabe einen Effekt auf die Nahrungsaufnahme (87). Mittlere Konzentrationen hingegen führen bei 7 tägiger Gabe zu einer Abnahme des Körpergewichts und des Fressverhaltens bei Mäusen (87).

Das Interesse dieser Arbeit besteht darin, alle möglichen systemischen Wechselwirkungen auszuschließen um einen direkten Einfluss des Obestatin auf die Ghrelinsekretion zu untersuchen.

Eine Perfusion mit Obestatin zeigte in keiner Konzentration (10^{-11}M , 10^{-9}M und 10^{-7}M) einen signifikanten Effekt auf die Total-Ghrelinfreisetzung. Allerdings fiel ein deutlicher „off-Effekt“ nach Beendigung der Obestatininfusion auf.

Schließlich konnte auch für das Aktive-Ghrelin keine Beeinflussung durch das in Konzentration 10^{-7}M verabreichte Obestatin aufgezeigt werden.

Die Desacyl-Ghrelin Konzentration wurde durch Perfusion mit Obestatin in der Konzentration 10^{-9}M tendenziell stimuliert, 10^{-7}M führte sogar zu einer signifikanten Stimulation der Desacyl-Ghrelinsekretion.

Interessant dabei ist, dass der Nervus vagus dabei eine tragende Rolle spielt, da bei Perfusion des isolierten Organmodells mit Desacyl-Ghrelin ohne vagale Vorstimulation weder ein stimulierender noch ein inhibitorischer Effekt auf den Obestatin Spiegel zu erkennen war. Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass ein Zusammenspiel aller drei Bestandteile, Nervus vagus, Obestatin und Desacyl-Ghrelin von Nöten ist, um eine Reaktion zu erzielen.

Um eine mögliche interaktive Wirkung zwischen Obestatin und Nervus vagus besser zu erkennen, zeigte eine Perfusion mit Obestatin bei gleichzeitig vagaler Stimulation eine konstante Total-Ghrelin Ausschüttung, wohingegen bei Beendigung der Obestatinperfusion und Beibehalten der vagalen Stimulation ein signifikanter Abfall der Ghrelin-Konzentration zu beobachten war.

Dieser Effekt ist am ehesten mit dem Abbruch der Obestatinzufuhr zu erklären (Off-Effect) und einer daraus kurzzeitig veränderten gastralen Sekretionsleistung.

Mit diesen *in vitro* durchgeführten Experimenten kann eine gegenteilige Wirkung des Obestatin auf das Ghrelin widerlegt werden und allenfalls von einem synergistisch unterstützenden Effekt ausgegangen werden.

Die Erkenntnisse der *in vivo* Versuche über die Ineffektivität des Obestatin auf den Energie-Haushalt (88) sowie die aktuellen *in vitro* Ergebnisse über einen eher synergistischen Effekt, widerlegen die These, dass es sich bei dem Obestatin um den Gegenspieler des Ghrelin handelt. So kann die Publikation von Gloucerol unterstützt werden, die eine Umbenennung des Obestatin in ein Ghrelin-assoziiertes Peptid fordert (92, 93). Letztlich handelt es sich bei dem Obestatin wahrscheinlich eher um ein Spaltprodukt, das bei der Entstehung von Ghrelin aus dem Vorläuferpeptid Präproghrelin entsteht, ähnlich wie das C-Peptid beim Insulin.

5.6. Auswirkungen von Insulin auf die Obestatinsekretion

In einigen Arbeiten wird dem Obestatin eine anorektische Wirkung zugesprochen (13, 94, 95). Aus diesem Grund könnte diesem Hormon eine Mitbeteiligung in der Regulation der Energie-Homöostase zugesprochen werden, wodurch auch eine Rolle im Glucosestoffwechsel erklärbar wäre.

Guo et al. entdeckte bei übergewichtigen Menschen ein Ungleichgewicht im Verhältnis zwischen Ghrelin und Obestatin. Bei diesen Testpersonen fand man präprandial eine erhöhte Ghrelin/Obestatin-Ratio (96). Auch die Forschergruppe um Bernd Beck kam zu dem Ergebnis, dass dicke Ratten präprandial einen höheren Plasma Ghrelin-Spiegel aufwiesen als deren dünne Vergleichsgruppe (97). Dies lässt die Hypothese aufkommen, dass vielleicht nicht nur ein erhöhter präprandialer Ghrelinspiegel, sondern auch ein erniedrigter präprandialer Obestatinwert dieses Ungleichgewicht hervorrufen könnte.

So kamen einige Studien zu dem Resultat, dass erniedrigte präprandiale Obestatin-Konzentrationen mit einem Diabetes mellitus Typ II, einer gestörten Glucoseregulation, sowie einer Insulinresistenz assoziiert waren (98, 99). Ähnliches zeigte Nakahara et al., er postulierte eine negative Korrelation zwischen nüchtern Obestatin, BMI, Glucose und Insulin (100).

Zugleich entdeckten Forscher eine Insulin-Signal-Kaskade im Gastrointestinaltrakt, was diesen somit zu einem insulinsensitiven Gewebe macht (101). Daher liegt es nahe, dass die postprandiale Insulinausschüttung einen Effekt auf die ebenfalls gastral sezernierten Hormone Ghrelin und Obestatin ausüben könnte.

Hinsichtlich des Ghrelins konnte gezeigt werden, dass ein postprandial kombinierter Anstieg von Glucose und Insulin zu einem Abfall der Ghrelin-Sekretion sowohl bei gesunden Probanden wie auch bei insulinresistentem Typ 2 Diabetikern führt (102).

Intraperitoneal verabreichtes Obestatin führte bei Mäusen zu einer 43-53% Reduktion der Nahrungsaufnahme sowie zu einer Abnahme der Glucoseexkursion bzw. Insulinsensitivität um 64-77% und 39-41% (14). Wobei letztere Erkenntnisse eher aus einer Veränderung des Appetits resultieren, als auf einen direkten Effekt des Obestatins auf die Insulinsekretion (14).

Die Arbeiten von Anderwald-Stadler kamen zu dem Ergebnis, dass eine intravenöse Insulin-Injektion eine signifikante Abnahme der Obestatinkonzentration bei Insulin-sensitiven Probanden (368 ± 14 pg/ml), nicht aber bei Insulin-resistenten, nach sich zog.

Im Gegensatz dazu wurde eine Insulin-induzierte Abnahme der Ghrelinsekretion sowohl bei Insulin-resistenten, wie auch sensitiven Menschen beobachtet. Dies führt zu der Annahme,

dass die präprandialen Obestatinwerte beim Menschen negativ mit einer Insulin-Sensitivität/bzw. positiv mit einer Resistenz korrelieren. Somit wäre es auch erklärbar, weshalb Probanden, die im Rahmen eines metabolischen Syndroms, eine Adipositas und eine Insulinresistenz mit konsekutiv dauerhaft erhöhten Insulinspiegeln entwickeln, erniedrigte präprandiale Obestatinwerte aufweisen.

Letztlich postulierte die Gruppe um Zhi-Fu Guo, dass übergewichtige Individuen im Gegensatz zu einer normalgewichtigen Vergleichsgruppe sowohl prä- als auch postprandial niedrigere Obestatinkonzentrationen aufzeigen (96).

Für Insulin existieren einige *in vivo* Studien bei Menschen und Nagetiere, die auf einen inhibitorischen Effekt des Insulins auf die Ghrelinfreisetzung hinweisen (103, 104, 105, 106, 107), die Wirkweise auf das Obestatin jedoch ist noch unbekannt.

Im gegenwärtigen Experiment, in dem gesunde Ratten ohne Störungen in der Glucose-Homöostase verwendet wurden, führte die Infusion von Insulin in der Konzentration $10^{-8}M$ zu einer tendenziellen Reduktion der Obestatinausscheidung, $10^{-6}M$ hingegen zeigte keinerlei Veränderungen. Letztlich ist unter Ausschaltung endogener Faktoren die Wirkung des Insulins auf Obestatin mit Hilfe der aktuellen Ergebnisse nicht sicher zu eruieren.

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass intraorganelle Wechselwirkungen für die gegenseitige Interaktion beider Hormone verantwortlich sind, ein direkter Zusammenhang aber ausgeschlossen werden kann.

5.7. Auswirkungen von Acyl- und Desacyl-Ghrelin auf die Obestatinsekretion

In dem vorangegangenen Abschnitt wurde bereits auf die Wirkung von Obestatin auf Ghrelin eingegangen, im nun folgenden Teil wurde das Augenmerk auf die Wirkung der Subtypen des Ghrelins auf die Obestatinsekretion gerichtet. Alle drei Abkömmlinge des Proghrelins (Acyl, Desacyl-Ghrelin und Obestatin) werden konkormitant von den A-Like-Zellen des Magen sezerniert.

Das orexigenetische Peptidhormon Ghrelin zirkuliert intarorganell hauptsächlich in zwei Formen, der acylierten und der desacylierten Form.

In Zeiten von Nahrungsmangel scheinen Obestatin und Acyl-Ghrelin, anders als auf den Magen, ähnliche Effekte auf das Pankreasgewebe auszuüben. So stimulieren beide Hormone die Glucagonsekretion und hemmen die PYY- und Somatostatinausscheidung aus den

Langerhansinseln des Pankreas von Ratten und Mäusen. Die Insulinsekretion konnte lediglich durch Obestatin in physiologisch relevanten Konzentrationen gehemmt werden (108). Demgegenüber beeinflusste das Desacyl-Ghrelin die pankretische Hormonsekretion nicht.

Es ist anzunehmen, dass die Wirkung des endogenen Acyl-Ghrelins, wie z.B. die Appetit-Regulation, die Adipogenese, der Energie-Verbrauch und die gastrointestinale Peristaltik (40), durch die gleichzeitige Sekretion von Obestatin und Desacyl-Ghrelin ausgeglichen wird. So konnte Van der Lely aufzeigen, dass Acyl-Ghrelin im menschlichen Organismus zu einer signifikanten Steigerung des Glucose- und Insulin-Levels führt (110). Bei zusätzlicher Gabe von Desacyl-Ghrelin konnte dieser Effekt jedoch nicht mehr reproduziert werden.

Dies führt zu der Mutmaßung, dass *in vivo* die Effekte des endogenen Acyl-Ghrelins und des Obestatins überschattet und/oder durch das Desacyl-Ghrelin abgeschwächt werden (109).

In Studien konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Desacyl-Ghrelin nicht um eine inaktive Form des Ghrelins handelt (111, 112, 113, 114, 115). Fernerhin nimmt es je nach Verabreichung gegensätzliche Wirkweisen an. So induzierte es eine Steigerung der Nahrungsaufnahme bei intrazerebroventrikulärer Administration, wohingegen eine periphere Verabreichung (i.p. und i.v.) zu einem anorektischen Effekt führte (116, 117).

Im menschlichen Organismus, in dem Desacyl-Ghrelin im Serum in höheren Konzentrationen vorgefunden wird als Acyl-Ghrelin, fungiert es als metabolisch, antiproliferativ und kardiovaskulär endokriner Faktor (118). So hatten Mäuse mit einer genetisch induzierten Überexpression von Desacyl-Ghrelin einen kleineren Body-mass-Index, ein vermindertes Fressverhalten, sowie einen herabgesetzten freien Fettsäure-Spiegel. Bei Menschen führte eine intravenöse Zufuhr zu einer früher einsetzenden nahrungsbezogenen Insulinantwort, zu einem gesteigerten Glucosemetabolismus sowie zu einer erhöhten Insulinsensitivität (110).

Lagaud et al. konnte belegen, dass sich Ghrelin und Obestatin bei gleichzeitiger Verabreichung *in vivo* dermaßen beeinflussen, dass weder eine Zu- noch eine Abnahme in der Nahrungsaufnahme beobachtet werden konnte. Bei alleiniger Verabreichung jedoch gegensätzliche Effekte beobachtet werden konnten. So führte i.p. verabreichtes Ghrelin zu einem Anstieg des Fressverhaltens bei Ratten (ca. 13-15,5 g) und Mäusen (ca. 3,1-4,1g), Obestatin hingegen bewirkte eine Verminderung (87). Aus dieser Erkenntnis wurde eine antagonistische Wirkung der beiden Hormone aufeinander vermutet.

In der vorliegenden Arbeit liegt das Interesse nun darin eine direkte Wirkung der Subtypen des Ghrelins auf die Obestatinsekretion aufzuzeigen, um hieraus eine mögliche Interaktion der Hormone unter Ausschluss systemischer Effekte aufzudecken.

Es konnte gezeigt werden, dass Acyl-Ghrelin in der Konzentration 10^{-7}M einen signifikant inhibitorischen Effekt auf die Obestatinfreisetzung ausübt, bei weiterer Verdünnung aber keine Beeinflussung mehr registrierbar war. Somit lässt sich eine Parallele zwischen den *in vitro* Versuchen und den Ergebnissen von Quader et al. aufzeigen (109).

Eine wie vermutet synergistische Wirkung des Desacyl-Ghrelins konnte nicht gezeigt werden, da weder die Konzentrationen 10^{-9}M noch 10^{-7}M einen stimulierenden Effekt auf den Obestatin Spiegel ausübten.

Dennoch muss kritisch hinterfragt werden, ob *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* Verhältnisse übertragbar sind, denn es ist zu vermuten, dass endogene Faktoren die Wirkung des Obestatin dermaßen beeinflussen, dass es zu einer synergistischen Wirkweise bezüglich des Ghrelins oder gar zu einem kompletten Wirkverlust kommt (92, 93).

5.8. Auswirkungen von Alter und Gewicht der Ratten

Bekannt ist bereits, dass bei übergewichtigen Zucker-Ratten der Plasma Ghrelinspiegel nach 24 stündigen Fasten höher ist als bei der normalgewichtigen Vergleichsgruppe (119).

Beck et al. postulierte darüber hinaus, dass diese Tatsache nicht nur auf fastende Ratten zutrifft, sondern auch bei selbständig fressenden übergewichtigen Ratten vorzufinden ist (120).

Andere Arbeiten widerlegten diese These, indem sie zeigten, dass adipöse Ratten, denen ebenfalls der Nahrungszugang für 24 Stunden verweigert wurde, einen niedrigeren präprandialen Plasma Ghrelin-Spiegel hatten als die dünne Vergleichsgruppe (121). Erklärbar ist dies mit der höheren Blutglucose-Konzentration bei Adipösen, welche den Körper daran hindert das hungerfördernde Peptidhormon Ghrelin zu sezernieren. Des Weiteren hemmt auch ein größeres Energie-Depot die Ausschüttung.

Nicht nur eine erniedrigte Konzentration, sondern auch ein verzögerter Wiederanstieg der Ghrelinsekretion nach dem Fasten wurde beobachtet.

So stieg bei dicken Ratten das totale und aktive Ghrelin erst nach 48 Stunden wieder an, bei den Dünnen dagegen schon nach 24 Stunden (121).

In dem hier durchgeführten Versuchsablauf konnte in den beiden Vergleichsgruppen kein signifikanter Unterschied in der Desacyl-Ghrelinsekretion beobachtet werden. Jedoch war bei den isolierten Organmodellen adipöser Ratten präprandial eine doppelt so hohe Konzentration an Desacyl-Ghrelin messbar als bei der ca. 200 g leichteren Versuchsgruppe. Überdies stieg auch bei *in vitro* Stimulation des Nervus vagus die Ghrelin-Konzentration bei den dicken Tieren höher an.

Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind höchstwahrscheinlich Ausdruck komplexer Regulationsmechanismen, die im Organismus stattfinden und bei *in vitro* Versuchen ausgeschaltet sind. Eine weitere Erklärung dieser Ergebnisse könnte auch in dem unterschiedlichen Alter der Versuchstiere liegen, denn die übergewichtigen Ratten in unserem Experiment waren im Durchschnitt $62,3 \text{ Tage} \pm 10,8 \text{ Tage}$ älter als die dünne Vergleichsgruppe. Diesbezüglich postulierte Saeko Akimoto-Takano und seine Mitarbeiter, dass die plasmatische Desacyl-Ghrelin Konzentration bei älteren Ratten höher ist als bei jüngeren, wohingegen die Konzentration des Acyl-Ghrelins im Alter abnimmt (122).

Beim Menschen verhält es sich gegensätzlich. So weisen adipöse Probanden einen niedrigeren Desacyl- und Total-Ghrelinspiegel auf, im Gegensatz dazu ist der Acyl-Ghrelin Gehalt im Vergleich zur dünneren Vergleichsgruppe signifikant erhöht. Dies ist letztendlich wahrscheinlich auf eine Adipositas-assoziierte Erhöhung des Leptins und Insulins zurückzuführen, welche beide hemmend auf die Ghrelinsekretion wirken (123).

Zhi-Fu Guo et al. entdeckte, dass dicke Menschen sowohl prä- als auch postprandial einen niedrigeren Plasma Ghrelinspiegel aufweisen als Dünne (91). So könnte eine Beteiligung des Ghrelins an der Entstehung der Adipositas bezweifelt werden. Aber das erhöhte Ghrelin/Obestatin-Verhältnis weicht bei übergewichtigen Menschen zu Gunsten des hungerfördernden Ghrelins stärker voneinander ab.

Eine weitere Erklärung für erniedrigte präprandiale Ghrelinwerte wäre eine physiologische Adaption des Körpers an eine erhöhte positive Energie-Balance, mit der Konsequenz der Downregulierung des Appetit-fördernden Hormons (124). So war bei 2 Monate alten Zucker-Ratten das Ghrelin herunterreguliert, womit ein Schutz gegen die Entstehung der Adipositas hervorgerufen werden konnte (119).

6. Zusammenfassung

Eine Reihe gastrointestinaler Peptide vermitteln das Sättigungsgefühl über vagal afferente Fasern an Hungerzentren im zentralen Nervensystem. Dabei spielen vor allem die Subzentren des Hypothalamus, die perifornikalen Neuronen, der Hirnstamm und die Hypophyse eine tragende Rolle (125).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine stimulierende Wirkung des Nervus vagus auf die Ghrelinsekretion aufgezeigt werden. So führte die Aktivierung des parasympathischen Nerven unabhängig von der Zeitdauer zu einer signifikanten Zunahme der Acyl-, Desacyl-, und Total-Ghrelinsekretion. Dieses Phänomen wird *in vivo* vor allem in der cephalen Phase der Nahrungsaufnahme beobachtet. So interpretierte Sugino et al. den präprandialen Anstieg des Plasmaghrelins bei Versuchstieren, die in Erwartung auf ihre Mahlzeit waren, als ein vagal vermittelter konditionierter Reflex (126).

Im Gegensatz dazu konnte kein Effekt der Vagusstimulation auf die Obestatinsekretion nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich durch die durchgeführten Versuche sagen, dass eine vagale Interaktion des Ghrelins mit dem zentralen Nervensystem besteht. Für Obestatin scheint das jedoch nicht gültig zu sein.

In der Entstehung der Adipositas spielt eine Insulinresistenz eine tragende Rolle. Im Rahmen dieser Beobachtungen wurde auch ein Zusammenhang mit dem von Adipozyten sezerniertem Adiponektin gesehen, welches bei adipösen Probanden signifikant erniedrigt war.

Des Weiteren wurde eine negative Korrelation zum Desacyl- und Acyl-Ghrelin beobachtet (55). Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass nicht nur die entgegengesetzte Stoffwechsellistung der beiden Hormone dafür verantwortlich ist (57), sondern auch ein möglicher direkter Einfluss aufeinander.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch Zugabe eines Adiponektinmisches eine signifikante Reduktion der Total-Ghrelinsekretion zu beobachten war. Diese Erkenntnis kann der Grundstein möglicher Therapieansätze für die Behandlung von Adipositas und deren Folgeerkrankungen sein. So wäre es durchaus denkbar, dass durch externe Zufuhr von Adiponektin nicht nur die Entstehung der Insulinresistenz verhindert werden kann, sondern auch durch die Verminderung des Hungergefühls die Entstehung des Übergewichts reduziert wird.

Das von Adipozyten sezernierte Resistin, welches im menschlichen Organismus eine Insulinresistenz vermittelt, ist wesentlich an einer Gewichtszunahme beim Menschen beteiligt (63, 64, 65). *In vitro* Experimente zeigten, dass die Perfusion des Rattenmagens mit Insulin eine signifikante Reduktion der Ghrelinsekretion zur Folge hatte (70). Daraus ergibt sich die Vermutung, dass womöglich eine direkte Wechselwirkung zwischen Resistin und Ghrelin besteht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese These widerlegt werden, denn es konnte kein Einfluss der beiden Hormone aufeinander entdeckt werden.

Der Magen als Hauptexpressionsort des Apelins und der Nachweis des Vorkommens in endokrinen Zellen sowie im zerebralen Sättigungszentrum, lassen eine Beteiligung des Apelins an der Sättigungskaskade vermuten. In der vorliegenden Arbeit führte jedoch eine *in vitro* Infusion des Rattenmagens mit Apelin weder in den Konzentrationen 10^{-10} M noch 10^{-8} M zu einer signifikanten Veränderung der Desacyl-Ghrelin Ausschüttung. Folglich konnte gezeigt werden, dass der Wirkmechanismus des Apelins vermutlich auf einer cerebrogastralen Verschaltung beruht und nicht auf eine direkte Interaktion mittels Ghrelin.

Um die direkte Wirkung zwischen Obestatin und Ghrelin zu untersuchen und um die *in vivo* möglichen Wechselwirkungen zu demaskieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ein *in vitro* Experiment verwendet.

Interessanterweise führte die Zugabe eines Acyl-Ghrelingemisches in der Konzentration 10^{-7} M zu einer signifikanten Abnahme der Obestatinsekretion.

Eine vermutete synergistische Wirkung des Desacyl-Ghrelins konnte nicht gezeigt werden, da weder die Konzentrationen 10^{-9} M noch 10^{-7} M einen stimulierenden Effekt auf den Obestatin Spiegel ausübten.

In den vorliegenden Experimenten konnte kein Effekt des Obestatin auf die gastrale Ghrelinsekretion nachgewiesen werden.

Vielmehr erhärtet sich die Vermutung, dass es sich bei dem Obestatin lediglich um ein Spaltprodukt bei der Entstehung von Ghrelin aus Präproghrelin handelt, als um ein Peptidhormon mit eigener Funktion.

Ein weiteres Interesse war es, die Auswirkung von Insulin auf die Obestatinsekretion zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Insulin in der Konzentration $10^{-8}M$ zu einer tendenziellen Verminderung der Obestatinausscheidung führte, $10^{-6}M$ jedoch keinerlei Veränderungen nach sich zog. Diese Erkenntnis bekräftigt ein weiteres Mal, dass dem Obestatin keine wesentliche Rolle in den Regulationsmechanismen der Ernährungskaskade zugeschrieben werden kann.

Des Weiteren konnte eine unterschiedliche Desacyl-Ghrelinsekretion bei dicken und dünnen Ratten aufgedeckt werden. Diese Beobachtung beruht jedoch vermutlich vielmehr auf das unterschiedliche Alter als auf das Körpergewicht der Tiere.

Zusammenfassend zeigen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten, dass Adiponektin zu einer deutlichen Verminderung des Ghrelinspiegels führt, was möglicherweise ein neuer Therapieansatz in der Bekämpfung der Adipositas darstellt. Resistin und Apelin hingegen hatten keinen wesentlichen Einfluss auf die Ghrelinsekretion im isolierten Rattenmagenmodell.

Zudem ergab sich, dass Obestatin anders wie von vielen Arbeitsgruppen postuliert, keine tragende Rolle in der Ernährungskaskade spielt. Denn es führte weder zu einer Reduktion der Ghrelinausscheidung, noch interagierte es mit dem Nervus vagus. Auch eine Wechselwirkung der beiden Hormone Ghrelin und Obestatin konnte widerlegt werden. Diese Erkenntnisse bekräftigen die Vermutung, dass das Obestatin womöglich nur als Spaltprodukt aus der Synthese von Ghrelin fungiert, die Wirkung auf den Energie-Organismus jedoch gering und von keiner relevanten Bedeutung ist, Effekte auf andere Organsysteme aber durchaus bestehen.

7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1:

Versuchsordnung zur Überprüfung des Effektes des Nervus vagus in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer auf die Ghrelinsekretion. In der gesamten Zeit wurde der Magen luminal mit einer auf pH 2 titrierten Natriumchloridlösung und vaskulär mit einer Krebs-Ringer-Puffer-Lösung perfundiert. Dabei schloss sich der Äquilibrationsphase eine Vorlauf- und Stimulationsphase an sowie die abschließende Endlaufperiode.

Abbildung 2:

Testung der Auswirkung des Nervus vagus auf die Obestatinsekretion. Während des gesamten Experiments wurde der Magen luminal mit einer auf pH 2 titrierten Natriumchloridlösung und vaskulär mit einer Krebs-Ringer-Puffer-Lösung perfundiert. Dabei schloss sich der Äquilibrationsphase eine Vorlauf- und Stimulationsphase an sowie die abschließende Endlaufperiode.

Abbildung 3:

Versuchsschema zur Überprüfung der Auswirkungen der gastrointestinalen Hormone auf die Ghrelinsekretion. Während des gesamten Experiments wurde der Magen luminal mit einer auf pH 2 titrierten Natriumchloridlösung und vaskulär mit einer Krebs-Ringer-Puffer-Lösung perfundiert. Die jeweiligen getesteten Hormone wurden in entsprechender Konzentration einer separaten Pufferlösung beigemischt und nach einer 10 minütigen Vorstimulation, über 10 Minuten perfundiert. Die Nachstimulation erfolgte wieder in reiner Pufferlösung und schließlich wurde der Versuch mit einer 15 minütigen Endlaufphase abgeschlossen.

Abbildung 4:

Überprüfung der antagonistischen Wirkung des Obestatins auf die gastrale Ghrelinsekretion. Der Magen wurde in dieser Versuchsordnung luminal konstant mit einer auf pH 2 titrierten Natriumchloridlösung perfundiert und vaskulär zunächst mit einer reinen Pufferlösung, dann nach 25 Minuten mit einer Obestatin versetzten Lösung und letztendlich wieder mit der substanzfreien Flüssigkeit perfundiert.

Abbildung 5:

Testen der Wirkung des Insulin auf die Obestatinsekretion. Der Magen wurde in dieser Versuchsanordnung luminal konstant mit einer auf pH 2 titrierten Natriumchloridlösung perfundiert und vaskulär abwechselnd mit reiner Pufferlösung und mit Insulin versetzten Puffergemischen perfundiert.

Abbildung 6:

Überprüfung der antagonistischen Wirkung des Acyl-Ghrelinsekretion auf die gastrale Obestatinsekretion. Der Magen wurde in dieser Versuchsanordnung luminal konstant mit einer auf pH 2 titrierten Natriumchloridlösung perfundiert und vaskulär zunächst mit einer reinen Pufferlösung, dann nach 25 Minuten mit einer Obestatin versetzten Lösung und letztendlich wieder mit der substanzfreien Flüssigkeit perfundiert.

Abbildung 7:

Versuchsanordnung zur Überprüfung der Wirkung des Desacyl-Ghrelin auf die gastrale Obestatinsekretion. Der Magen wurde in dieser Versuchsanordnung luminal konstant mit einer auf pH 2 titrierten Natriumchloridlösung perfundiert und vaskulär abwechselnd mit reiner Pufferlösung und mit Desacyl-Ghrelin perfundiert.

Abbildung 8:

Versuchsanordnung zur Testung des Einflusses der Körpermasse und des Alterns auf die Ghrelinsekretion. In der gesamten Zeit wurde der Magen luminal mit einer auf pH 2 titrierten Natriumchloridlösung und vaskulär mit einer Krebs-Ringer-Puffer-Lösung perfundiert. Dabei schloss sich der Äquilibrationsphase eine Vorlauf- und Stimulationsphase an sowie die abschließende Endlaufperiode.

Abbildung 9:

Graphische Darstellung der Veränderung des Total-Ghrelin bei einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 20 Minuten und einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 10:

Graphische Darstellung der Veränderung des Total-Ghrelin bei einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 30 Minuten und einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 11:

Graphische Darstellung der Veränderung des Acyl-Ghrelin bei einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 10 Minuten und einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 12:

Graphische Darstellung der Veränderung des Desacyl-Ghrelin bei einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 10 Minuten und einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 13:

Graphische Darstellung der Veränderung der Obestatinsekretion bei einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 20 Minuten und einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 14:

Graphische Darstellung der Veränderung der Total-Ghrelinsekretion bei einer 10 minütigen Infusion von Adiponektin in einer Konzentration von 10^{-8} M (n=4) während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 15:

Graphische Darstellung der Veränderung der Acyl-Ghrelinsekretion bei Infusion von Resistin in einer Konzentration von 10^{-8} M (n=4) während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 16:

Graphische Darstellung der Veränderung der Desacyl-Ghrelinsekretion bei Infusion von Resistin in einer Konzentration von 10^{-8} M (n=4) während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 17:

Graphische Darstellung der Veränderung der Desacyl-Ghrelinsekretion bei Infusion von Resistin in einer Konzentration von 10^{-10} M (n=4) während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2 über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 18:

Graphische Darstellung der Veränderung der Desacyl-Ghrelinsekretion bei Infusion von Apelin in einer Konzentration von 10^{-8} M (n=4) während einer 30 minütigen konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 19:

Graphische Darstellung der Veränderung der Desacyl-Ghrelinsekretion bei Infusion von Apelin in einer Konzentration von 10^{-10} M (n=2) während einer 30 minütigen konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz bei einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 20:

Graphische Darstellung der Veränderung der Total-Ghrelinsekretion bei einer 10 minütigen Infusion von Obestatin in einer Konzentration von 10^{-11} M (n=4) während eines intragastralen pH-Werts von 2 und einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 21:

Graphische Darstellung der Veränderung der Total-Ghrelinsekretion bei einer 10 minütigen Infusion von Obestatin in einer Konzentration von 10^{-9} M (n=4) während eines intragastralen pH-Werts von 2 und einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 22:

Graphische Darstellung der Veränderung der Total-Ghrelinsekretion bei einer 10 minütigen Infusion von Obestatin in einer Konzentration von 10^{-7}M ($n=4$) während eines intragastralen pH-Werts von 2 und einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $\text{pg}/\text{min} \pm \text{SEM}$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 23:

Graphische Darstellung der Veränderung der Acyl-Ghrelinsekretion bei einer 10 minütigen Infusion von Obestatin in einer Konzentration von 10^{-7}M ($n=3$) während einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 30 Minuten und einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $\text{pg}/\text{min} \pm \text{SEM}$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 24:

Graphische Darstellung der Veränderung der Desacyl-Ghrelinsekretion bei einer 10 minütigen Infusion von Obestatin in einer Konzentration von 10^{-9}M ($n=4$) während eines intragastralen pH-Werts von 2 und einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $\text{pg}/\text{min} \pm \text{SEM}$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 25:

Graphische Darstellung der Veränderung der Desacyl-Ghrelinsekretion bei einer 10 minütigen Infusion von Obestatin in einer Konzentration von 10^{-7}M ($n=4$) während eines intragastralen pH-Werts von 2 und einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 30 Minuten. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $\text{pg}/\text{min} \pm \text{SEM}$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 26:

Graphische Darstellung der Veränderung der Obestatinsekretion bei Infusion von Insulin in einer Konzentration von 10^{-6}M ($n=6$) und 10^{-8}M ($n=6$) über einen Zeitraum von 15 Minuten bei einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in $\text{pg}/\text{min} \pm \text{SEM}$ gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 27:

Graphische Darstellung der Veränderung der Obestatinsekretion bei einer Infusion von Acyl-Ghrelin in einer Konzentration von 10^{-7} M (n=7) über einen Zeitraum von 20 Minuten, sowie einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 28:

Graphische Darstellung der Veränderung der Obestatinsekretion bei einer Infusion von Acyl-Ghrelin in einer Konzentration von 10^{-9} M (n=5) über einen Zeitraum von 20 Minuten, sowie einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 29:

Graphische Darstellung der Veränderung der Obestatinsekretion bei einer Infusion von Desacyl-Ghrelin in einer Konzentration von 10^{-7} M (n=6) und 10^{-9} M (n=6) über einen Zeitraum von 15 Minuten und einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Abbildung 30:

Graphische Darstellung der Veränderung der Desacyl-Ghrelinsekretion bei einer konstanten Vagusstimulation mit einer Frequenz von 10 Hz über einen Zeitraum von 20 Minuten und einem intragastralen pH-Wert von 2. Auf der Ordinate wurden die Mittelwerte in pg/min \pm SEM gegen die Zeit in min auf der Abszisse aufgetragen.

Tabelle 1: Herkunftsverzeichnis der verwendeten Substanzen

8. Abkürzungen

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
BMI	Body-Mass- Index
BRD	Bundesrepublik Deutschland
ca.	Circa
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholecystokinin
ChAT	Cholin acetyltransferase
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
EEG	Elektro-Enzephalographie
EFS	Elektrische Feldstimulation
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
GHRH	Growth hormone releasing hormone
GHRP	Growth hormone releasing peptide
GH-Sekretion	Growth Hormone
GLP 1	Glucagon-like peptide 1
GVA	Afferente vagale Fasern
HDL	High Density Lipoprotein
Hz	Hertz
i.a.	Intrarteriell
i.c.v.	Intracerebroventriculäre
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
ICAM 1	Intracellular adhesion molecule 1
IL8	Interleukin 8
irGRL	Immunreaktivität auf Präproghrelin
irOBS	Immunreaktivität
MCP1	Monocyte chemotactic protein-1
MEK	Mitogen-activated Protein Kinase
mg	Milligramm
min	Minute

mM	Millimolar
mol	Mol
Ms	Millisekunde
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NREM	Non-Rapid Eye Movement
PCK	Protein-Kinase C
PCNA	Proliferation cell nuclear antigen
PDGF	Platelet-derived growth factor
PEPCK	Phosphoenolpyruvate-carboxykinase
PRL	Prolaktin
PTx	Pertussis toxin
PVR	Proliferative Vitreoretinopathie
PYY	Peptide YY
REM	Rapid Eye Movement
s.	Sekunde
SEM	Standart error of the mean (Standartabweichung vom Mittelwert)
SOCS-3	Suppressor of Cytokine signaling 3
Tab.	Tabelle
TNF α	Tumor Nekrose Faktor
TRH	Thyreotropin Releasing Hormon
TSH	Thyroid stimulating hormon
UCPs 1	Uncoupling Protein 1
VCAM 1	Vascular cell adhesion molecular
WHO	World Health Organisation
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. Literaturverzeichnis

- 1) World Health Organization, Regional Office for Europe, Obesity in Europe. <http://www.euro.who.int/obesity>.26.05.2008
- 2) National Audit Office, Tackling Obesity in England. The stationery Office: London (2001)
- 3) Weihrauch T., Internistische Therapie. Urban und Fischer, München (2002); 14:867-871
- 4) Akio I, Akihiro A, Cyril Y. B, Mantovani G, Laviano M. Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *The FASEB Journal*. (2004); **18**: 439-456
- 5) Stengel A, Taché Y. Regulation of Food Intake: The Gastric X/A-like Endocrine Cell in the Spotlight. *Curr Gastroenterol Rep*. (2009); **11**:448-454
- 6) Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Niijima A, Fujino MA, Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* (2001); **120**: 337–345
- 7) Levin F, Edholm T, Schmidt P, Gryback P, Jacobsson H, Degerblad M, Hoybye C, Holst J, Rehfeld J, Hellstrom P, Naslund E. Ghrelin stimulates gastric emptying and hunger in normal-weight humans. *J Clin Endocrinol Metab* (2006); **91**: 3296–3302
- 8) Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* (2000); **276**: 905–908
- 9) Sato N, Kanai S, Takano S, Kurosawa M, Funakoshi A, Miyasaka K. Central administration of ghrelin stimulates pancreatic exocrine secretion via the vagus in conscious rats. *Jpn J Physiol* (2003); **53**: 443–449
- 10) Choi K, Roh SG, Hong YH, Shrestha YB, Hishikawa D, Chen C, Kojima M, Kangawa K, Sasaki S. The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology* (2003); **144**: 754–759
- 11) Kim M, Yoon C, Jang P, Park Y, Shin C, Park H, Ryu J, Pak Y, Park J, Lee K, Kim S, Lee H, Kim Y, Park K. The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* (2004); **18**: 2291–2301
- 12) Muccioli G, Pons N, Ghe C, Catapano F, Granata R, Ghigo E. Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol* (2004); **498**: 27–35
- 13) Zhang J, Ren P-G, Avsian-Kretchmer O, Luo C-W, Rauch R, Klein C, Hsueh A. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* (2005); **310**: 996–999
- 14) Green B, Irwin N, Flatt P. Direct and indirect effects of obestatin peptides on food intake and the regulation of glucose homeostasis and insulin secretion in mice. *Peptides* (2007); **28**: 981-987

- 15) Lippel F, Erdmann J, Lichter N, Tholl S, Wagenpfeil S, Adam O, Schusdziarra V. Relation of plasma obestatin levels to bmi, gender, age and insulin. *Horm Metab Res.* (2008); **40**: 806-812
- 16) Schusdziarra V, Bender H, Pfeiffer E. Release of bombesin-like immunoreactivity from the isolated perfused rat stomach. *Regul. Pept.* (1993); **7**: 21-29
- 17) Yalow R, Berson S. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J clin invest* (1960); **39**: 1157-1175
- 18) Tang S, Jiang Q, Zhang Y, Zhu X, Shu G, Gao P, Feng D, Wang X, Dong X. Obestatin: its physicochemical characteristics and physiological functions. *Peptides* (2008); **4**: 639-645
- 19) Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* (1999); **402**: 656-660
- 20) Siok L Dun, G Cristina Brailoiu, Eugen Brailoiu, Jun Yang, Jaw Kang Chang, Nae J Dun. Distribution and biological activity of obestatin in the rat. *Journal of Endocrinology* (2006); **191**: 481-489
- 21) Barreiro M, Gaytán F, Caminos E, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Diéguez C, Tena-Sempere M. Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expressin in rat testis. *Biology of Reproduction* (2002); **67**: 1768–1776
- 22) Berridge M. Neuronal calcium signaling. *Neuron* (1998); **21**: 13–26
- 23) Augustine G, Santamaria F, Tanaka K. Local calcium signaling in neurons. *Neuron* (2003); **40**: 331–346
- 24) Nogueiras R, Pfluger P, Tovar S, Arnold M, Mitchell S, Morris A, Perez-Tilve A, Vázquez M, Wiedmer P, Castañeda T, DiMarchi R, Tschöp M, Schurmann A, Joost H, Williams L, Langhans W, Diéguez C. Effects of Obestatin on Energy Balance and Growth Hormone Secretion in Rodents. *Endocrinology* (2007); **148**: 21-26
- 25) De Smet B, Thijs T. Effect of peripheral obestatin on gastric emptying and intestinal contractility in rodents. *Neurogastroenterol Motil* (2007); **19**: 211-217
- 26) Bresciani E, Rapetti D, Dona F. Obestatin inhibits feeding but does not modulate GH and corticosterone secretion in the rat. *Journal of Endocrinol Invest* (2006); **29**: 16-18
- 27) Robbins S, Mixon R, Wilson D, Hart C, Robertson J, Westra I, Planck S, Rosenbaum J. Platelet-derived growth factor ligands and receptors immunolocalized in proliferative retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (1994); **35**: 3649-3663
- 28) Armstrong D, Augustin A, Spengler R, Al-Jada A, Nickola T, Grus F, Koch F. Detection of vascular endothelial growth factor and tumor necrosis factor alpha in epiretinal membranes of proliferative diabetic retinopathy, proliferative vitreoretinopathy and macular pucker. *Ophthalmologica.* (1998); **212**: 410-414
- 29) Elnor S, Elnor V, Jaffe G, Stuart A, Kunkel S, Strieter R. Cytokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *Curr Eye Res.* (1995); **14**: 1045-1053
- 30) Camiña J, Campos J, Caminos J, Dieguez C, Casanueva F. Obestatin-mediated proliferation of human retinal pigment epithelial cells: regulatory mechanisms. *J Cell Physiol.* (2007); **211**: 1-9

-
- 31) Mészárosová M, Sirotki A.V, Grossmann R, Darlak K, Valenzuela F. The effect of obestatin on porcine ovarian granulosa cells. *Anim Reprod Sci.* (2008); **108**: 196-207
 - 32) Sirotkin A, Grossmann R. Effects of ghrelin and its analogues on chicken ovarian granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol.* (2008); **34**: 125-134
 - 33) Carlini V, Schiöth H, De Barioglio S. Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* (2006); **352**: 907-912
 - 34) Carlini V, Varas M, Cragolini A, Schiöth H, Scimonelli T, De Barioglio S. Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to Ghrelin. *Biochem Biophys Res Commun.* (2004); **313**: 635-641
 - 35) Szentirmai E, Krueger J. Obestatin alters sleep in rats. *Neurosci Lett.* (2006); **404**: 222-226
 - 36) Szentirmai E, Hajdu I, Obal F Jr, Krueger J. Ghrelin-induced sleep responses in ad libitum fed and food-restricted rats. *Brain Research* (2006); **1088**: 131–140
 - 37) Samson W, White M, Price , Ferguson A. Obestatin acts in brain to inhibit thirst. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* (2007); **292**: 637-643
 - 38) Zirrari P, Longchamps R, Epelbaum J. Obestatin partially affects Ghrelin stimulation of food growth hormone secretion in rodents. *J. Endocrinol.* (2007); **128**: 1648-1653
 - 39) Pazos Y, Alvarez C, Camiña J, Casanueva F. Stimulation of extracellular signal-regulated kinases and proliferation in the human gastric cancer cells KATO-III by obestatin. *Growth Factors* (2007); **25**: 373-381
 - 40) Granata R, Settanni F, Gallo D, Trovato L, Biancone L, Cantaluppi V, Nano R, Annunziata M, Campiglia P, Arnoletti E, Ghè C, Volante M, Papotti M, Muccioli G, Ghigo E. Obestatin promotes survival of pancreatic beta-cells and human islets and induces expression of genes involved in the regulation of beta-cell mass and function. *Diabetes* (2008); **57**: 967-979
 - 41) Egido E, Hernández R, Marco J, Silvestre R. Effect of obestatin on insulin, glucagon and somatostatin secretion in the perfused rat pancreas. *Regul Pept.* (2009); **152**: 61-66
 - 42) Chanoine J, Wong A, Barrios V. Obestatin, acylated and total ghrelin concentrations in the perinatal rat pancreas. *Horm Res* (2006); **66**: 81-88
 - 43) Williams D, Grill H, Cummings D, Kaplan J. Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology* (2003); **144**: 5184-5187
 - 44) Lee H, Wang G, Englander E, Kojima M, Greeley G. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* (2002); **143**: 185-190
 - 45) Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijjima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* (2002); **123**: 1120–1128
 - 46) Le Roux C, Neary N, Halsey T, Small C, Martinez-Isla A, Ghatei M, Theodorou N, Bloom S. Ghrelin does not stimulate food intake in patients with surgical procedures involving vagotomy. *J Clin Endocrinol Metab* (2005); **90**: 4521–4524

-
- 47) Goucerol G, Million M, Adelson D. Lack of interaction between peripheral injection of CCK and obestatin in the regulation of gastric satiety signalling in rodents. *Peptides* (2006); **27**: 2811-2819
- 48) Kapica M, Zabielska M, Puzio I, Jankowska A, Kato I, Kuwahara A, Zabielski R. Obestatin stimulates the secretion of pancreatic juice enzymes through a vagal pathway in anaesthetized rats - preliminary results. *J Physiol Pharmacol.* (2007); **58**: 123-130
- 49) Hotta K, Funahashi T, Bodkin N. Circulating concentration of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* (2001); **50**: 1126-1133
- 50) Lara-Castro C, Fu Y, Chung BH, Garvey WT. Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* (2007); **18**: 263-270
- 51) Beltowski J. Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit.* (2003); **9**: 55-61
- 52) Mlinar B, Marc J, Janez A, Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clin Chim Acta.* (2007); **375**: 20-35
- 53) Bacha F, Saad R, Gungor N, Arslanian SA. Adiponectin in youth: relationship to visceral adiposity, insulin sensitivity, and beta-cell function. *Diabetes Care* (2004); **27**: 1519-1520
- 54) Arnaiz P, Acevedo M, Barja S, Aglony M, Guzmán B, Cassis B, Carvajal J, Moreno M, Navarrete C, Berríos X. Adiponectin levels, cardiometabolic risk factors and markers of subclinical atherosclerosis in children. *Int J Cardiol.* (2008)
- 55) Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, Molina A, Gómez J, Gutiérrez C, Simón I, Soler J, Richart C. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obesity research* (2004); **12**: 962-971
- 56) Ott, V, Fasshauer M, Dalski A. Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression. *Horm Metab Res* (2002); **34**: 640-645
- 57) Edén Engström B, Burman P, Holdstock C, Karlsson FA. Effects of growth hormone (GH) on ghrelin, leptin, and adiponectin in GH-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab.* (2003); **88**: 5193-5198
- 58) Vilarrasa N, Vendrell J, Maravall J, Broch M, Estepa A, Megia A, Soler J, Simón I, Richart C, Gómez J. Distribution and determinants of adiponectin, resistin and ghrelin in a randomly selected healthy population. *Clinical endocrinology* (2005); **63**: 329-335
- 59) Stepan C, Bailey S, Bhat S, Brown E, Banerjee R, Wright C, Patel H, Ahima R, Lazar M. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* (2001); **409**: 307-312
- 60) Silha J, Krsek M, Skrha J, Sucharda P, Nyomba B, Murphy L. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *Eur J Endocrinol.* (2003); **149**: 331-335
- 61) Reilly M, Lehrke M, Wolfe M, Rohatgi A, Lazar M, Rader D. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation.* (2005); **111**: 932-939

-
- 62) Frankel D, Vasani R, D'Agostino R, Benjamin E, Levy D, Wang T, Meigs J. Resistin, adiponectin, and risk of heart failure the Framingham offspring study. *J Am Coll Cardiol.* (2009); **53**: 754-762
- 63) Osawa H, Tabara Y, Kawamoto R, Ohashi J, Ochi M, Onuma H, Nishida W, Yamada K, Nakura J, Kohara K, Miki T, Makino H. Plasma resistin, associated with single nucleotide polymorphism -420, is correlated with insulin resistance, lower HDL cholesterol, and high-sensitivity C-reactive protein in the Japanese general population. *Diabetes Care* (2007); **30**: 1501-1506
- 64) Skilton M, Celermajer D. The effects of obesity-related peptides on the vasculature. *Curr Vasc Pharmacol.* (2006); **4**: 79-85
- 65) Degawa-Yamauchi M, Bovenkerk J, Juliar B, Watson W, Kerr K, Jones R, Zhu Q, Considine R. Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab.* (2003); **88**: 5452-5455
- 66) Stepan C, Wang J, Whiteman E, Birnbaum M, Lazar M. Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol cell Biol.* (2005); **25**: 1569-1575
- 67) Kusminski C, da Silva N, Creely S, Fisher F, Harte A, Baker A, Kumar S, McTernan P. The in vitro effects of resistin on the innate immune signaling pathway in isolated human subcutaneous adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* (2007); **92**: 270-276
- 68) Wellen K, Hotamisligil G. Inflammation, stress, and diabetes. *Eur J Clin Invest.* (2005); **115**: 1111-1119
- 69) Luo Z, Zhang Y, Li F, He J, Ding H, Yan L, Cheng H. Resistin induces insulin resistance by both AMPK-dependent and AMPK-independent mechanisms in HepG2 cells. *Endocrine* (2009); **36**: 60-69
- 70) Kircher F. Einfluss des Nervus vagus und gastrointestinaler Hormone auf die Ghrelinsekretion im Magen der Ratte.
- 71) Susaki E, Wang G, Cao G, Wang H, Englander E, Greeley GH Jr. Apelin cells in the rat stomach. *Regul pept* (2005); **129**: 37-41
- 72) Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, Lenkei Z, El Messari S, Gallatz K, Corvol P, Palkovits M, Llorens-Cortès C. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem* (2001); **77**: 1085-1096
- 73) Habata Y, Fujii R, Hosoya M, Fukusumi S, Kawamata Y, Hinuma S, Kitada C, Nishizawa N, Murosaki S, Kurokawa T, Onda H, Tatemoto K, Fujino M. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim Biophys Acta.* (1999); **1452**: 25-35
- 74) O'Carroll A, Selby T, Palkovits M, Lolait S. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta.* (2000); **1492**: 72-80
- 75) Charles C. Putative role for apelin in pressure/volume homeostasis and cardiovascular disease. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* (2007); **5**: 1-10
- 76) Zeng X, Zhang L, Wang H, Lu L, Ma L, Tang C. Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat. *Peptides* (2009); **30**: 1144-1152

- 77) Lee D, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam A, Liu Y, Osmond D, George S, O'Dowd B. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem* (2000); **74**: 34–41
- 78) Edinger A, Hoffman T, Sharron M, Lee B, Yi Y, Choe W, Kolson D, Mitrovic B, Zhou Y, Faulds D, Collman R, Hesselgesser J, Horuk R, Doms R. An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* (1998); **72**: 7934–7940
- 79) Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii R, Habata Y, Hinuma S, Kitada C, Honda S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem.* (2000); **275**: 21061–21067
- 80) Puffer BA, Sharron M, Coughlan CM, Baribaud F, McManus CM, Lee B, David J, Price K, Horuk R, Tsang M, Doms RW. Expression and coreceptor function of APJ for primate immunodeficiency viruses. *Virology* (2000); **276**: 435–444
- 81) Etsuko K, Wei S. Inhibitory effect of human saliva on HIV-1 infectivity. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* (2001); **24**: 152-159
- 82) Maguire J, Kleinz M, Pitkin S, Davenport A. [Pyr¹]Apelin-13 Identified as the Predominant Apelin Isoform in the Human Heart. Vasoactive Mechanisms and Inotropic Action in Disease. *Hypertension.* (2009); **54**: 598-604
- 83) Greeley G, Thompson J, Ishizuka J, Cooper C, Levin M, Gore S, Cohn D. Inhibition of glucose-simulated insulin release in the perfused rat pancreas by parathyroid secretory protein-I (chromogranin-A). *Endocrinology* (1989); **124**: 1235–1238
- 84) Wang G, Anini Y, Wei W, Qi X, OCarroll A, Mochizuki T, Wang H, Hellmich M, Englander E, Greeley GH Jr. Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology.* (2004); **145**: 1342-1348
- 85) Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, Chiba S, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* (2007); **148**: 2690-2697
- 86) Taheri S, Murphy K, Cohen M, Sujkovic E, Kennedy A, Dhillon W, Dakin C, Sajedi A, Ghatei M, Bloom S. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* (2002); **291**: 1208–1212
- 87) Lagaud G, Young A, Acena A, Morton M, Barrett T, Shankley N. Obestatin reduces food intake and suppresses body weight gain in rodents. *Biochem Biophys Res Commun.* (2007); **357**: 264-269
- 88) Nogueiras R, Pfluger P, Tovar S, Arnold M, Mitchell S, Morris A, Perez-Tilve D, Vázquez M, Wiedmer P, Castañeda T, DiMarchi R, Tschöp M, Schurmann A, Joost H, Williams L, Langhans W, Diéguez C. Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology.* (2007); **148**: 21-26
- 89) Bassil , Häglund Y, Brown J, Rudholm T, Hellström PM, Näslund E, Lee K, Sanger GJ. Little or no ability of obestatin to interact with ghrelin or modify motility in the rat gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol.* (2007); **150**: 58-64

-
- 90) Yamamoto D, Ikeshita N, Daito R, Herningtyas E, Toda K, Takahashi K, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K, Okimura Y. Neither intravenous nor intracerebroventricular administration of obestatin affects the secretion of GH, PRL, TSH and ACTH in rats. *Regulatory peptides* (2007); **138**: 141-144
- 91) Zhang J, Klein C, Pei-Gen R, Kass S, Ver Donck L, Moechars D, et al. Response to comment on "Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake". *Science*. (2007); **315**: 766
- 92) Gourcerol G, St-Pierre D, Taché Y. Lack of obestatin effects on food intake: should obestatin be renamed ghrelin-associated peptide (GAP)? *Regulatory peptides* (2007); **141**: 1-7
- 93) Gourcerol G, Taché Y. Obestatin--a ghrelin-associated peptide that does not hold its promise to suppress food intake and motility. *Neurogastroenterol Motil.* (2007); **19**: 161-165
- 94) Tschöp M, Smiley D, Heiman M. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* (2000); **407**: 908-913
- 95) Ukkola O, Pöykkö S. Ghrelin, growth and obesity. *Ann Med Interne* (2002); **34**: 102-108
- 96) Guo Z, Zheng X, Qin Y, Hu J, Chen S, Zhang Z. Circulating preprandial ghrelin to obestatin ratio is increased in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* (2007); **92**: 1875-1880
- 97) Beck B, Richy S, Stricker-Krongrad A. Ghrelin and body weight regulation in the obese Zucker rat in relation to feeding state and dark/light cycle. *Exp Biol Med (Maywood)*. (2003); **228**: 1124-1131
- 98) Park W, Oh Y, Kim G, Kim S, Paik K, Han S, Kim A, Chu S, Kwon E, Kim S, Jin D. Obestatin is not elevated or correlated with insulin in children with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* (2006); **92**: 229-234
- 99) Qi X, Li L, Yang G, Liu J, Li K, Tang Y, Liou H, Boden G. Circulating obestatin levels in normal subjects and in patients with impaired glucose regulation and type 2 diabetes mellitus. *Clinical Endocrinology* (2007); **66**: 593-597
- 100) Nakahara T, Harada T, Yasuhara D, Shimada N, Amitani H, Sakoguchi T, Kamiji M, Asakawa A, Inui A. Plasma obestatin concentrations are negatively correlated with body mass index, insulin resistance index, and plasma leptin concentrations in obesity and anorexia nervosa. *Biol Psychiatry* (2008); **64**: 252-255
- 101) Croset M, Rajas F, Zitoun C, Hurot J, Montano S, Mithieux G. Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* (2001); **50**: 740-746
- 102) Anderwald-Stadler M, Krebs M, Promintzer M, Mandl M, Bischof M, Nowotny P, Kästenbauer T, Luger A, Prager R, Anderwald C. Plasma obestatin is lower at fasting and not suppressed by insulin in insulin-resistant humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*(2007); **293**: 1393-1398
- 103) 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**: 313-316
- 104) McCowen K, Maykel J, Bistrrian B, Ling P. Circulatin ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *J Endocrinol.* (2002); **175**: 7-11

- 105) Mohlig, M, Spranger J, Otto B, Ristow M, Tschöp M, Pfeiffer A. Euglycemic hyperinsulinemia, but not lipid infusion decreases circulating ghrelin levels in humans. *J Endocrinol. Invest* (2002); **25**: 36-38
- 106) Saad M, Bernaba B, Hwu C, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E, Boyadjian R. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* (2002); **87**: 3997-4000
- 107) Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal M, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* (2002); **87**: 240-244
- 108) Qader S, Håkanson R, Rehfeld J, Lundquist I, Salehi A. Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: a study on isolated islets from mouse and rat pancreas. *Regul Pept.* (2008); **146**: 230-237
- 109) Nogueiras R, Tschöp M. Separation of conjoined hormones yields appetite rivals. *Science* (2005); **310**: 985-986
- 110) Van der Lely A. Ghrelin and new metabolic frontiers. *Horm Res.* (2009); **71**: 129-133
- 111) 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, Graziani A. Ghrelin and de-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* (2004); **159**: 1029-1037
- 112) Cassoni P, Ghe C, Marrocco T, Tarabra E, Allia E, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Papotti M, Muccioli G. 2004 Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell line. *Eur J Endocrinol* (2004); **150**: 173-184
- 113) Muccioli G, Pons N, Ghe C, Catapano F, Granata R, Ghigo E. Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Eur J Pharmacol* (2004); **498**: 27-35
- 114) Bedendi I, Allatti G, Marcantoni A, Malan D, Catapano F, Ghe C, Deghenghi R, Ghigo E, and Muccioli G. Cardiac effects of ghrelin and its endogenous derivatives des-octanoyl ghrelin and des-Gln14-ghrelin. *Eur J Pharmacol* (2003); **476**: 87-95
- 115) Thompson N, Gill D, Davies R, Loveridge N, Houston P, Robinson I, Wells T. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly *in vivo* by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* (2004); **145**: 234-242
- 116) Chen C, Imui A, Asakawa A, Fujino K, Kato I, Chen C, Ueno N, Fujimiya M. Des-acyl ghrelin acts by CRF type 2 receptors to disrupt fasted stomach motility in conscious rats. *Gastroenterology* (2005); **129**: 8-25
- 117) Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* (2005); **54**: 18-24
- 118) Cassoni P, Papotti M, Ghè C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, Deghenghi R, Reissmann T, Ghigo E, 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**: 1738-1745

-
- 119) Beck B, Max J, Fernetto B, Richey S. Adaptation of ghrelin levels to limit body weight gain in the obese Zucker rat. *Biochem Biophys Res Commun.* (2004); **318**: 846-851
- 120) Beck B, Richey S, Stricker-Krongrad A. Feeding response to ghrelin agonist and antagonist in lean and obese Zucker rats. *Basic life sciences* (2004); **76**: 473-478
- 121) Ariyasu H, Takaya K, Hosoda H, Iwakura H, Ebihara K, Mori K, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the active form of ghrelin. *Endocrinology* (2002); **143**: 3341-3350
- 122) Akimoto-Takano S, Sakurai C, Kanai S, Hosoya H, Ohta M, Miyasaka K: Differences in the Appetite-Stimulating Effect of Orexin, Neuropeptide Y and Ghrelin among Young, Adult and Old Rats. *Neuroendocrinology* (2005); **82**: 256-263
- 123) Barazzoni R, Zanetti M, Ferreira C, Vinci P, Pirulli A, Mucci M, Dore F, Fonda M, Ciocchi B, Cattin L, Guarnieri G. Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* (2007); **92**: 3935-3940
- 124) Tschöp M, Weyer C, Tataranni P, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman M. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* (2001); **50**: 707-709
- 125) Cummings D, Schwartz M. Genetics and Pathophysiology of human obesity. *Annu.Rev.Med.* (2003); **54**: 453-471
- 126) Sugino T, Hasegawa Y, Kikkawa Y, Yamaura J, Yamagishi M, Kurose Y, Kojima M, Kangawa K, Terashima Y. A transient ghrelin surge occurs just before feeding in a scheduled meal-fed sheep. *Biochem Biophys Res Commun* (2002); **295**: 255-260
- 127) Tsubone T, Masaki T, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCP1 mRNA expression in brown adipose tissue in mice. *Regulatory Peptides* (2005); **130**: 97-103

10. Danksagung

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 meiner Doktormutter, Frau PD. Dr. med. Otto für die Überlassung des Themas, die Einbindung in seine Forschungsgruppe und die motivierende Unterstützung.

Fernerhin möchte ich Herrn Prof. Dr. med. M. Reincke für die freundliche Aufnahme in die 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 Lichter sehr herzlich.