

---

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass simultan mit Ghrelin (13 µg/kg) verabreichtes Bombesin in einer Dosierung von 8 µg die Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme hemmt. Im Gegensatz dazu hatte die gleichzeitige Applikation von Ghrelin (13 µg/kg) und Amylin in den Dosierungen 1 µg und 5 µg keinen hemmenden Einfluss auf die durch Ghrelin stimulierte Nahrungsaufnahme. In dieser Studie konnte des Weiteren ein starker Anstieg der Neuronenaktivität im Nucleus Paraventricularis nach simultaner Gabe von Ghrelin (13 µg/kg) und Bombesin (8 µg/kg) beobachtet werden.

### 4.2 Wirkdauer von Ghrelin und Bombesin

Viele Studien beschreiben die orexigenen Effekte von Ghrelin. Die intracerebroventrikuläre (icv.) Gabe von Ghrelin stimuliert die Nahrungsaufnahme (M. Tschöp *et al.* 2000). Bei Ratten und Mäusen führt die tägliche periphere Administration von Ghrelin über einen verminderten Fettverbrauch zu einer Zunahme des Körpergewichts (M. Tschöp *et al.* 2000). Die Stimulation der Nahrungsaufnahme durch peripher oder zentral appliziertes Ghrelin ist bei nicht gefasteten Ratten zu beobachten (A. M. Wren *et al.* 2000). Der stimulierende Effekt auf die Nahrungsaufnahme ist auch in Wachstumshormon (GH) defizienten Ratten nachweisbar (M. Nakazato *et al.* 2001). Aus diesem Grund scheint die Stimulation der Nahrungsaufnahme durch Ghrelin unabhängig von der Ghrelin induzierten GH-Sekretion zu sein (M. Nakazato *et al.* 2001). In zahlreichen Studien konnte nach einmaliger Gabe von Ghrelin vor allem ein kurzzeitiger Effekt auf die Nahrungsaufnahme beobachtet werden. Die Applikation von Ghrelin direkt in den Nucleus Arcuatus (NARC) von Ratten steigert die Nahrungsaufnahme signifikant innerhalb der ersten Stunde nach Injektion (A. M. Wren *et al.* 2001b). Auch bei Mäusen führt eine intraperitoneale (ip.) Injektion von Ghrelin zu einem raschen Anstieg der Nahrungsaufnahme in den ersten 30 Minuten (L. Wang *et al.* 2002). Diese Beobachtung konnte ebenso bei Ratten bestätigt werden (A. M. Wren *et al.* 2001b; P. Kobelt *et al.* 2005). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Die ip. Gabe von 13 µg Ghrelin steigerte die Nahrungsaufnahme innerhalb der ersten 30 Minuten um ~100%. 13 µg/kg Ghrelin ist die geringste Dosis, die nach ip. Injektion bei Ratten zu einer signifikanten Steigerung der Nahrungsaufnahme führt und entspricht einer Konzentration von ~1 nmol/Ratte (A. M. Wren *et*

*al.* 2001b). Die Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme konnte mittels einer simultanen Verabreichung von 8 µg Bombesin gehemmt werden. Die Nahrungsaufnahme wurde in dieser Gruppe um 73% reduziert verglichen mit der Vehikel + 13 µg Ghrelin-Gruppe. Der inhibierende Effekt von Bombesin auf die durch Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme war über den gesamten Messzeitraum von zwei Stunden zu beobachten.

Vergleichbar mit den vorliegenden Ergebnissen konnte ein lang anhaltender hemmender Einfluss von CCK-8S auf die Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme bei simultaner ip. Applikation von Ghrelin und CCK-8S beobachtet werden (P. Kobelt *et al.* 2005). Die aktive Form von Ghrelin, Acyl-Ghrelin, ist instabil in Blut und Serum und wird schnell zu Des-acyl Ghrelin hydrolysiert (H. Hosoda *et al.* 2004). Für die Deoctanylierung von Acyl-Ghrelin werden verschiedene Esterasen verantwortlich gemacht (C. De Vriese *et al.* 2004). Im Vergleich zur aktiven Form von Ghrelin ist Des-acyl Ghrelin relativ stabil (H. Hosoda *et al.* 2004). Die schnelle Hydrolyse von Ghrelin könnte der Grund für die im Experiment beobachtete kurze Wirkdauer von Ghrelin sein. CCK-8 hat mit drei Minuten zwar auch eine kurze Halbwertszeit (R. D. Reidelberger *et al.* 1989), jedoch sind nachgeschaltete neuronale Mechanismen als Grund für die lang anhaltende Wirkung auf die Nahrungsaufnahme denkbar. Der lang andauernde hemmende Einfluss von CCK auf die Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme konnte auch in einer anderen Studie gezeigt werden (Y. Date *et al.* 2005). Auch Bombesin ist lang wirksam, vermutlich wegen der Resistenz gegen enzymatische Degradation (T. W. Moody, Z. Merali 2004). Nach einer Inkubation von Bombesin in einem Kulturmedium über einen Zeitraum von 60 Minuten ist kein Aktivitätsverlust zu erkennen (K. Tateishi *et al.* 1985). Der über den gesamten Messzeitraum nachweisbare hemmende Effekt von Bombesin könnte mit dessen langsamen Abbau begründet werden. Andererseits sind auch nachgeschaltete Regulationsmechanismen im Hypothalamus als Ursache für die lange Wirksamkeit von Bombesin denkbar.

#### **4.3 Fehlender Einfluss von Amylin auf die Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme**

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme bei Ratten durch die simultane Applikation von Bombesin in einer Dosis von 8 µg gehemmt werden kann. Amylin in einer Dosierung von 1 µg und 5 µg hingegen, simultan appliziert mit Ghrelin, war nicht in der Lage, die orexigenen Effekte von Ghrelin zu beeinflussen. Die Tatsache, dass Bombesin, nicht aber Amylin, in der Lage war, die Wirkung von peripherem Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme zu inhibieren, lässt vermuten, dass dieser Effekt spezifisch für Bombesin ist.

Bombesin und Amylin weisen verschiedene Wirkmechanismen auf und üben ihre Effekte über unterschiedliche neuronale Netzwerke aus. Amylinrezeptoren finden sich in vielen Organen, jedoch in hoher Dichte im Hirnstamm, in der AP und im NTS (P. M. Sexton *et al.* 1994). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass periphere Gaben von Amylin eine Expression des neuronalen Aktivitätsmarkers Fos in der AP und im NTS induzieren (N. E. Rowland *et al.* 1997; T. Riediger *et al.* 2004). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Thermoablation von aufsteigenden Nervenfasern zur AP und zum NTS des Hirnstamms die anorexigenen Effekte von Amylin reduziert (T. A. Lutz *et al.* 1998b). Diese Daten lassen vermuten, dass Amylin seine Wirkung auf die Nahrungsaufnahme vornehmlich über die AP und den NTS entfaltet.

Bonaz *et al.* konnten eine Fos-Induktion im NTS nach peripherer Gabe von Bombesin beobachten (B. Bonaz *et al.* 1993). Auch in der vorliegenden Studie zeigte sich eine Fos-Aktivierung im NTS nach Gabe von Bombesin. Der anorexigene Effekt von peripherem Bombesin war nach einer Läsion von AP und NTS abgeschwächt (E. E. Ladenheim, R. C. Ritter 1993). War nur die AP ausgeschaltet, war der nahrungsreduzierende Effekt von Bombesin nachweisbar (E. E. Ladenheim, R. C. Ritter 1993). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die anorexigenen Effekte von Bombesin über den NTS vermittelt werden. Damit zeigt sich, dass der NTS sowohl an der Effektvermittlung von Amylin als auch von Bombesin beteiligt ist.

Die Applikation von Ghrelin in einer Dosis von 13  $\mu\text{g}$  führte in der vorliegenden Studie nicht zu einer gesteigerten Fos-Expression in Neuronen des NTS. Jedoch konnte in einer anderen Studie nach Gabe von 10 nmol Ghrelin, also der 10-fachen Dosis, eine gesteigerte Neuronenaktivierung im NTS nachgewiesen werden (Y. Li *et al.* 2006). Die Verwendung einer 10-fach höheren Ghrelinkonzentration in den Experimenten von Li *et al.* könnte die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen dieser und der vorliegenden Studie in der Ghrelin stimulierten Fos-Expression im NTS erklären.

In der vorliegenden Studie führte die periphere Applikation von Ghrelin zu einer Fos-Induktion im NARC und im PVN. Auch in anderen Studien konnte eine Neuronenaktivierung in diesen Kerngebieten gezeigt werden (A. K. Hewson, S. L. Dickson 2000; J. Rüter *et al.* 2003; P. Kobelt *et al.* 2005). Deshalb ist eine Involvierung dieser hypothalamischen Nuclei in die Vermittlung der orexigenen Ghrelineffekte wahrscheinlich.

Im PVN, nicht aber im NARC, konnte in der 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin + 8  $\mu\text{g}$  Bombesin-Gruppe eine signifikante Steigerung der neuronalen Aktivität beobachtet werden. Das legt die Vermutung nahe, dass im PVN eine Effektvermittlung und Interaktion von Ghrelin und Bombesin stattfindet.

In Tracing-Studien von Sawchenko *et al.* konnten direkte Verbindungen vom NTS zum PVN nachgewiesen werden (P. E. Sawchenko *et al.* 1985). Über diese Projektionen könnte die Bombesin induzierte Aktivierung von PVN-Neuronen vermittelt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass auch CCK in der Lage ist, bei simultaner Applikation mit Ghrelin, die Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme bei Ratten zu hemmen (P. Kobelt *et al.* 2005). Im Gegensatz zur vorliegenden Studie wurde dieser Effekt im NARC vermittelt (P. Kobelt *et al.* 2005). Somit zeigt sich, dass CCK und Bombesin die Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme hemmen können, jedoch über differente zentrale Mechanismen.

Im Gegensatz zu Bombesin ist Amylin nicht in der Lage, Neurone des PVN zu aktivieren (N. E. Rowland *et al.* 1997), obwohl direkte Projektionen vom NTS zum PVN existieren (P. E. Sawchenko *et al.* 1985). Es wäre somit denkbar, dass Amylin andere Zellgruppen im NTS aktiviert als Bombesin. Die durch Amylin aktivierbaren Neurone im NTS scheinen keine Projektionen zum PVN zu haben. Deshalb ist es nicht wahrscheinlich, dass Amylin seine Wirkung über den PVN vermittelt wie beispielsweise Bombesin. Dieser Umstand könnte die Beobachtung erklären, dass in unserer Studie Amylin, bei der simultanen peripheren Applikation mit Ghrelin, nicht in der Lage war, die Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme zu hemmen.

Die Bombesin vermittelte Hemmung der Ghrelin induzierten Nahrungsaufnahme kann somit als spezifisch angesehen werden und wird wahrscheinlich durch eine Interaktion der beiden Peptide in Neuronen des PVN vermittelt.

#### **4.4 Fehlender Einfluss von Amylin und Bombesin auf die Nahrungsaufnahme nicht gefasteter Tiere**

In der vorliegenden Studie verursachte die alleinige Applikation von 1 oder 5 µg Amylin und 4 oder 8 µg Bombesin keine signifikanten Effekte auf die Nahrungsaufnahme bei frei gefütterten Ratten, obwohl diese Dosierungen in anderen Studien ausreichten, einen hemmenden Effekt von Amylin und Bombesin auf die Nahrungsaufnahme zu bewirken (T. A. Lutz *et al.* 1994; T. A. Lutz *et al.* 1995b). Viele dieser Studien wurden an gefasteten Ratten durchgeführt, um den Einfluss anorexigener Peptide auf die nach dem Fasten beobachtete vermehrte Nahrungsaufnahme zu untersuchen (T. A. Lutz *et al.* 1994; T. A. Lutz *et al.* 1998b). Deshalb ist es wahrscheinlich, dass der fehlende Effekt von Amylin und Bombesin auf die Nahrungsaufnahme mit dem ungefasteten Zustand der Ratten begründet werden kann.

Auch der Zeitpunkt des Experiments könnte einen Einfluss auf die Wirkung sättigungsregulatorischer Substanzen haben und soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

#### 4.5 Einfluss der zirkadianen Rhythmik auf die Experimente

Die intraperitoneale Injektion von 1 µg und 5 µg Amylin, appliziert zu Beginn der Lichtphase, hatte bei frei gefütterten Ratten keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme. Im Kontrollexperiment jedoch, welches zu Beginn der Nachtphase durchgeführt wurde, zeigte sich eine signifikante Reduktion der Nahrungsaufnahme in der Gruppe, die ip. Injektionen von Amylin in einer Dosierung von 5 µg erhielt.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Amylin, peripher appliziert in verschiedenen Dosen (1-10 µg/kg), die Nahrungsaufnahme zu Beginn der Dunkelphase bei gefasteten und frei gefütterten Ratten hemmt (T. A. Lutz *et al.* 1994; R. D. Reidelberger *et al.* 2001). Es wäre also denkbar, dass der nahrungsinhibitorische Effekt von Amylin vom Zeitpunkt der Peptidinjektion abhängig ist. Auch in anderen Studien führte die Amylingabe zu Beginn der Nachtphase zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme (T. A. Lutz *et al.* 1995b; P. A. Rushing *et al.* 2000b).

Diese Beobachtungen könnten mit der zirkadianen Rhythmik von Ratten erklärt werden. Ratten sind nacht aktive Nagetiere, deren physiologische Nahrungsaufnahme nicht am Tag, sondern in der Nacht stattfindet. Für Ghrelin konnte eine zirkadiane Rhythmik beobachtet werden (B. Bodosi *et al.* 2004). Während die Ghrelinwerte bei Ratten in der Dunkelphase steigen, fallen sie in der Lichtphase ab (B. Bodosi *et al.* 2004; J. Sanchez *et al.* 2004). In einer anderen Studie konnte der Maximalwert für Ghrelin eine Stunde nach Beginn der Dunkelphase gemessen werden (B. Bodosi *et al.* 2004). Sanchez *et al.* zeigten einen Anstieg der Ghrelinkonzentration im Blut von Ratten unmittelbar vor der Dunkelphase und einen Abfall direkt danach (J. Sanchez *et al.* 2004). Die Beobachtungen, dass die Ghrelinspiegel bei Ratten nachts erhöht sind, lassen eine stimulatorische Funktion von Ghrelin auf die basale Nahrungsaufnahme vermuten. Deshalb lassen sich die Effekte von exogenem Ghrelin besser in der Lichtphase heraus arbeiten, da hier die endogenen Ghrelinwerte sehr niedrig sind.

Die Experimente zur Untersuchung der Nahrungsaufnahme fanden in dem Zeitraum zwischen 08.00 Uhr und 11.00 Uhr statt, in der Lichtphase, in welcher Ratten ihr niedrigstes Nahrungsaufnahmeverhalten zeigen. In diesem Intervall kann die Wirkung von exogenem Ghrelin und die Hemmung durch anorexigene Substanzen wie Amylin und Bombesin am besten heraus gearbeitet werden.

Sollen hingegen die Effekte von anorexigenen Peptiden wie Amylin und Bombesin auf die Nahrungsaufnahme erfasst werden, so eignet sich die Dunkelphase besser, da Ratten hier physiologisch die höchste Nahrungsaufnahme zeigen und eine Inhibition gut darstellbar ist. Diese Annahme konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Während Amylin in einer

Dosis von 1  $\mu\text{g}$  und 5  $\mu\text{g}$ , verabreicht in der Lichtphase, keinen Effekt auf die Nahrungsaufnahme zeigte, konnte im Kontrollexperiment, welches zu Beginn der Dunkelphase stattfand, ein die Nahrungsaufnahme inhibierender Effekt nachgewiesen werden.

#### 4.6 Wege der Transmission von Ghrelin und Bombesin

Vor kurzem konnten Date *et al.* zeigen, dass CCK die Ghrelin induzierte Senkung der Aktivität gastraler vagaler Afferenzen hemmt und auch die neuronale Aktivität im NARC vermindert (Y. Date *et al.* 2005). Dieselbe Gruppe konnte zeigen, dass afferente vagale Projektionen zum Gehirn in die Vermittlung der Ghrelineffekte auf die Nahrungsaufnahme involviert sind (Y. Date *et al.* 2002).

Die periphere Gabe von Bombesin induziert eine Aktivitätssteigerung von gastralen vagalen Afferenzen (E. Yoshida-Yoneda *et al.* 1996). Es konnten jedoch keine Bindungsstellen für Bombesin am N. Vagus detektiert werden (G. J. Schwartz *et al.* 1997). Aus diesem Grund ist eine direkte Wirkung von Bombesin auf den N. Vagus nicht wahrscheinlich. Auch CCK führt zu einer Steigerung der Aktivität vagaler Afferenzen (E. Yoshida-Yoneda *et al.* 1996). CCK-Rezeptoren konnten am N. Vagus gefunden werden (G. J. Schwartz *et al.* 1997). Deshalb ist eine direkte Wirkung von CCK auf den N. Vagus anzunehmen. Die Gabe von Bombesin führt zu einer Freisetzung von CCK (E. E. Ladenheim *et al.* 1999). Die Verabreichung eines CCK-Rezeptor-Antagonisten hemmt die Bombesin induzierte Aktivierung des N. Vagus (E. Yoshida-Yoneda *et al.* 1996). Eine indirekte Beeinflussung des N. Vagus von Bombesin über CCK ist somit denkbar. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Bombesin über eine Erhöhung des Muskeltonus im Magen zu einer Steigerung neuronaler Aktivität im N. Vagus führt (G. J. Schwartz *et al.* 1997). Obgleich keine Bombesin-Rezeptoren am N. Vagus gefunden werden konnten, wäre doch eine sekundäre Beeinflussung der vagalen Afferenzen durch Bombesin über beispielsweise CCK oder eine Muskeltonussteigerung im Magen denkbar (G. J. Schwartz *et al.* 1997). Eine komplette subdiaphragmatische Vagotomie bei Ratten hat keinen Einfluss auf die Bombesin induzierte Hemmung der Nahrungsaufnahme (J. Gibbs 1985). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Gabe eines CCK-Rezeptor-Antagonisten keinen Effekt auf die Bombesin induzierte Nahrungsaufnahme hat (E. E. Ladenheim *et al.* 1999). Deshalb erscheint eine Vermittlung der Bombesin induzierten Hemmung der Nahrungsaufnahme durch den N. Vagus nicht wahrscheinlich.

Eine Zerstörung afferenter Nervenfasern mittels Capsaicin-Behandlung führt zu einer Hemmung des anorexigenen Effekts von Bombesin (J. A. Stuckey *et al.* 1985; D. Michaud *et al.* 1999). Eine Vermittlung der Effekte von Bombesin über spinale Afferenzen ist deshalb zu vermuten.

Werden die anorexigen wirkenden Peptide CCK und Bombesin simultan verabreicht, so addieren sich die die Nahrungsaufnahme hemmenden Effekte (L. J. Stein, S. C. Woods 1981). Bombesin und CCK scheinen deshalb über verschiedene Mechanismen zu wirken (L. J. Stein, S. C. Woods 1981). Aus den genannten Gründen ist eine Vermittlung der Bombesin induzierten Hemmung der Nahrungsaufnahme über spinale Afferenzen anzunehmen.

Es erscheint deshalb unwahrscheinlich, dass der inhibitorische Bombesin-Effekt auf die Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme über den N. Vagus oder die Freisetzung von CCK vermittelt wird. Eine Interaktion dieser beiden Peptide im Hypothalamus erscheint möglich und soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

#### **4.7 Einfluss von Bombesin und Ghrelin auf CRF-Neurone**

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, induzieren Bombesin und Ghrelin den neuronalen Marker Fos in verschiedenen Bereichen des Rattengehirns. Während Bombesin zu einer Fos-Expression im PVN, NTS und in der AP führt (B. Bonaz *et al.* 1993; B. H. Li, N. E. Rowland 1996), induziert Ghrelin diesen neuronalen Marker hauptsächlich im NARC (L. Wang *et al.* 2002; Y. Date *et al.* 2005) und zu geringen Teilen im PVN (J. Rüter *et al.* 2003; P. Kobelt *et al.* 2005).

In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass nicht nur die Gabe von Ghrelin, sondern auch die simultane Injektion von Ghrelin und 8 µg Bombesin zu einer Fos-Expression im PVN führte. Die anschließende Phänotypisierung der aktivierten Neurone in den Versuchsgruppen ergab, dass die Fos exprimierenden Neurone im PVN CRF positiv waren. Während in der 13 µg Ghrelin + 8 µg Bombesin-Gruppe ~22% der CRF positiven Neurone Fos-Aktivität zeigten, waren in der 13 µg Ghrelin-Gruppe nur ~10% der CRF enthaltenden Neurone aktiviert. Es ist bekannt, dass CRF anorexigene Effekte vermittelt und die icv. Injektion dieses Peptids zu einer Hemmung der Nahrungsaufnahme bei Ratten führt. (T. Shibasaki *et al.* 1988; S. C. Heinrichs *et al.* 1992a).

Ghrelin wird vorrangig in X/A ähnlichen Zellen des Magens produziert (Y. Date *et al.* 2000). Fasten führt zu einer Erhöhung der Ghrelinspiegel bei Ratten (M. Tschöp *et al.* 2000). Die ip. Gabe von Ghrelin induziert wie bereits beschrieben eine Fos-Aktivierung in Neuronen des NARC (L. Wang *et al.* 2002; J. Rüter *et al.* 2003). 90% dieser Fos aktivierten Neurone im

---

NARC sind NPY positiv (L. Wang *et al.* 2002). NPY/AgRP positive Neurone im NARC senden Efferenzen zu Orexinneuronen, die im lateralen Hypothalamus lokalisiert sind (T. Sakurai 1999). Sakurai *et al.* konnten in einer früheren Studie zeigen, dass Orexin bei Ratten zu einer Induktion von Hunger führt und die Nahrungsaufnahme steigert (T. Sakurai *et al.* 1998). Deshalb erscheint es möglich, dass Ghrelin über eine Aktivierung von NPY/AgRP positiven Neuronen des NARC Orexinzellen im lateralen Hypothalamus stimuliert und somit die Nahrungsaufnahme induziert (Abbildung 4.1).

Die Gabe von Ghrelin führte in der vorliegenden Studie zu einem Anstieg der Fos-Expression in CRF positiven Neuronen. Auch in anderen Studien mit Nagetieren konnte eine erhöhte Konzentration von CRF nach Applikation von Ghrelin gezeigt werden (A. Asakawa *et al.* 2001a; A. M. Wren *et al.* 2002). Eine weitere Studie konnte eine stimulatorische Wirkung von Ghrelin auf ACTH zeigen (A. M. Wren *et al.* 2000). Die Ausschüttung von ACTH wird durch CRF stimuliert (D. T. Chalmers *et al.* 1996). Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass Ghrelin über die Ausschüttung von CRF zu einer gesteigerten Freisetzung von ACTH führt.

Dem Modell von Cowley *et al.* zufolge hemmt zentrales Ghrelin die GABA-Freisetzung im PVN über eine Aktivierung von NPY/AgRP positiven Neuronen (M. A. Cowley *et al.* 2003). Diese Hemmung von GABA-Neuronen könnte der Grund für die beobachtete Disinhibierung von CRF-Neuronen im PVN nach Applikation von Ghrelin sein (M. A. Cowley *et al.* 2003). Die vorliegende Studie bestätigt die Beobachtung, dass Ghrelin CRF enthaltende Neurone im PVN aktiviert. Auch peripheres Ghrelin könnte somit über NPY/AgRP positive Projektionen, die vom NARC zum PVN ziehen, GABA-Neurone im PVN hemmen. Diese Hemmung könnte zu einer Disinhibierung von CRF-Neuronen und somit zu einer Freisetzung von CRF führen (Abbildung 4.1).



Abbildung 4.1

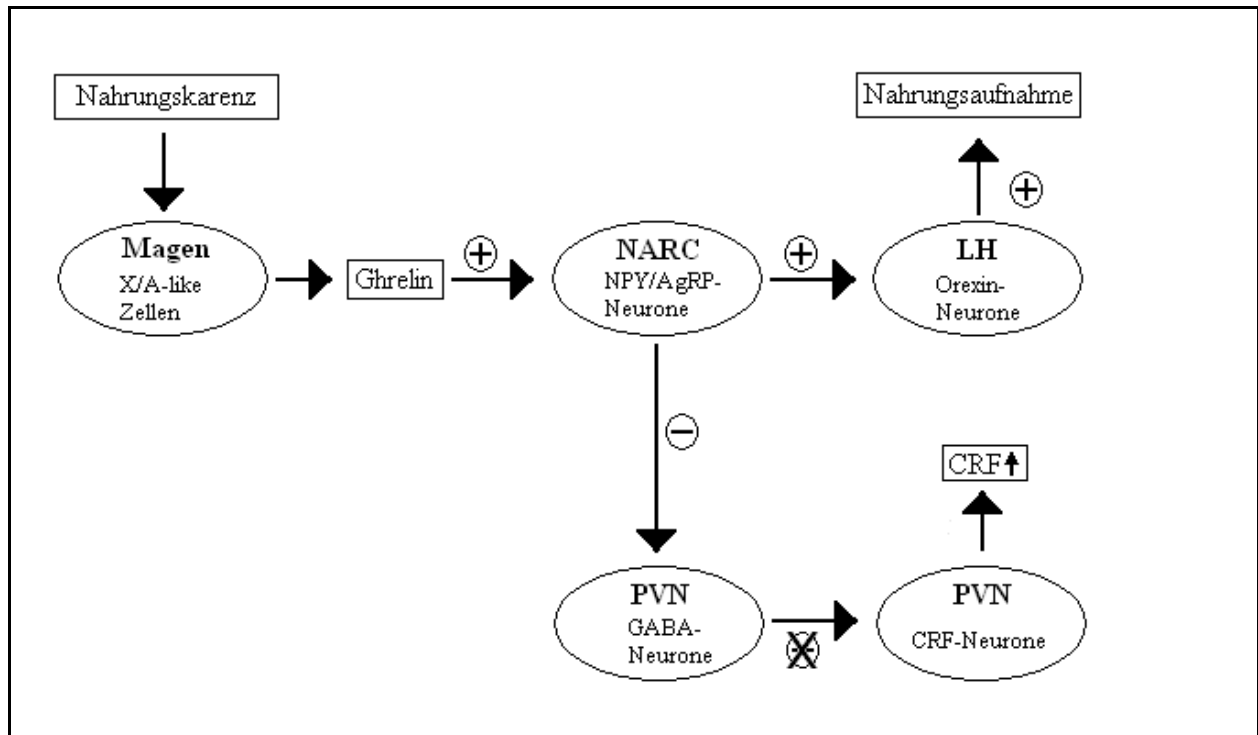


Abbildung 4.1: Hypothetische Wirkung von peripherem Ghrelin auf CRF-Neurone im PVN

Bombesin wird postprandial aus Mukosazellen des Magens freigesetzt (V. Schusdziarra *et al.* 1986) (Abbildung 4.2). In einigen Studien konnte die icv. Gabe von Bombesin eine Steigerung der Freisetzung von ACTH bewirken (L. Olsen *et al.* 1992; P. Kent *et al.* 2001b). Die Vermittlung der Bombesin induzierten Ausschüttung von ACTH erfolgt wahrscheinlich über die Freisetzung von hypothalamischem CRF (L. Olsen *et al.* 1992). Im Gegensatz dazu konnte nach peripherer Applikation von Bombesin keine erhöhte ACTH-Freisetzung beobachtet werden (L. Olsen *et al.* 1992). Deshalb ist zu vermuten, dass peripher appliziertes Bombesin keinen Einfluss auf die Freisetzung von hypothalamischem CRF hat. In der vorliegenden Studie hatte peripher verabreichtes Bombesin ebenfalls keinen Effekt auf die Aktivierung CRF positiver Neurone im PVN.

Es ist hypothetisch möglich, dass GABA-Neurone zu einer basalen Hemmung von CRF-Neuronen im PVN führen (M. A. Cowley *et al.* 2003). Daher wäre es denkbar, dass diese supprimierten CRF-Neurone nicht empfänglich für einen Stimulus wie beispielsweise durch Bombesin sind.

Die basale Hemmung von CRF positiven Neuronen durch GABA-Interneurone könnte in der vorliegenden Studie somit der Grund für die fehlende Aktivierung von CRF-Neuronen durch peripheres Bombesin sein (Abbildung 4.2).

Abbildung 4.2

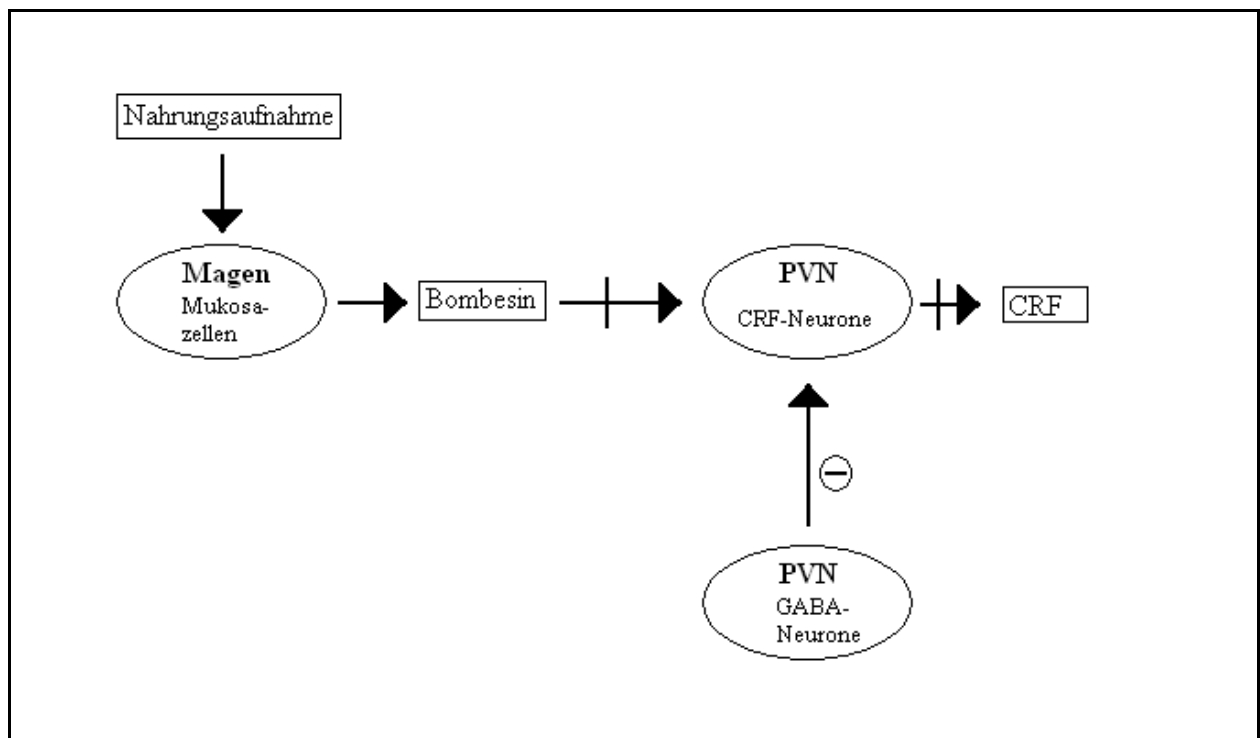


Abbildung 4.2: Hypothetische Wirkung von peripherem Bombesin auf CRF-Neurone im PVN

In der vorliegenden Studie waren nach simultaner Applikation von 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin und 8  $\mu\text{g}$  Bombesin ~60% der Fos positiven Neurone im PVN auch CRF positiv. Umgekehrt zeigten von diesen CRF positiven Zellen im PVN ~22% der Neurone auch Fos-Aktivität. Legt man die Hypothese von Cowley *et al.* zugrunde, könnte Ghrelin in dieser Gruppe CRF-Neurone durch eine NPY vermittelte Hemmung von GABA-Neuronen disinhibieren. Somit wären die enthemmten CRF-Neurone im PVN empfänglicher für die Stimulation durch Bombesin und könnten CRF freisetzen. Es ist demnach möglich, dass simultan appliziertes Bombesin (8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) und Ghrelin (13  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) über das in Abbildung 4.3 genannte Modell zu einer Steigerung der CRF-Neuronenaktivierung im PVN führt.

Abbildung 4.3

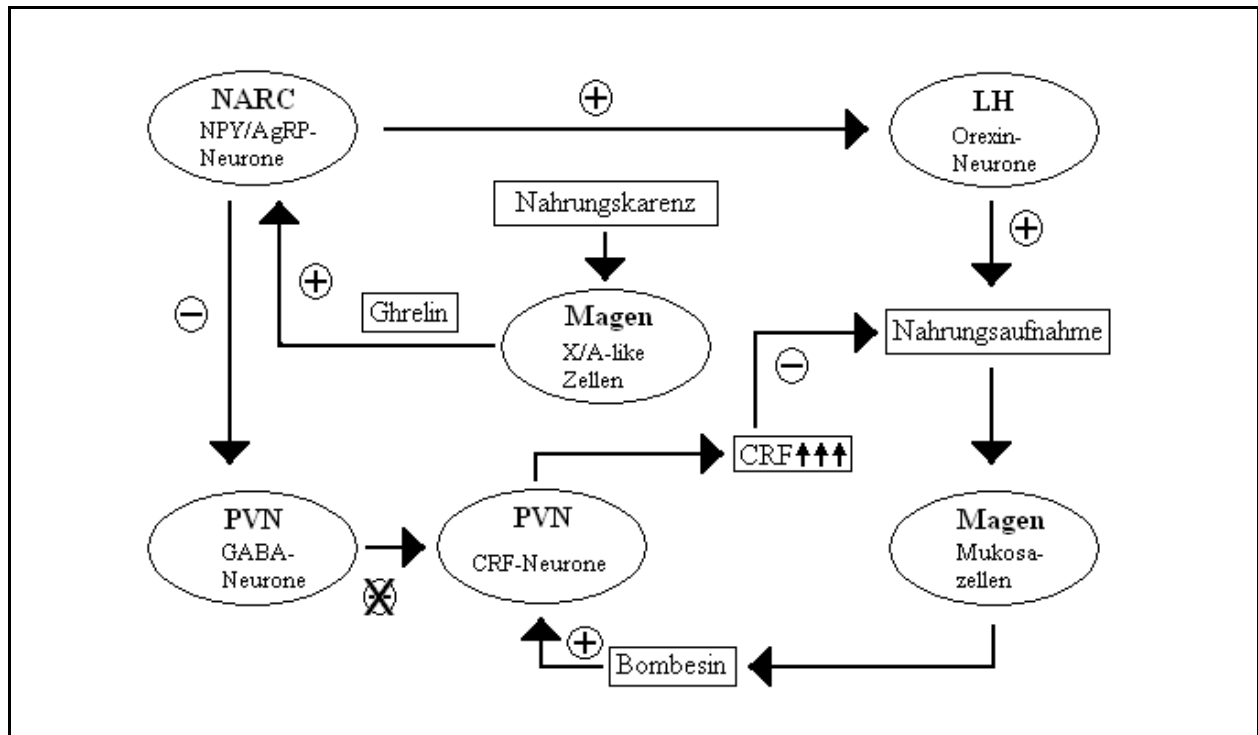


Abbildung 4.3: Hypothetische Wirkung von Ghrelin und Bombesin auf CRF-Neurone im PVN

Die simultane Injektion von Ghrelin und 4  $\mu\text{g}$  Bombesin führte sowohl im PVN als auch im NARC zu einem Anstieg der Fos-IR. Bombesin in einer Dosis von 4  $\mu\text{g}$  war jedoch weder im NARC noch im PVN in der Lage, die Ghrelin induzierte Fos-Expression zu beeinflussen. In dieser Gruppe war in beiden Gehirnkernen deshalb nur der Ghrelineffekt sichtbar. Bei der anschließenden Phänotypisierung von Neuronen des PVN ergab sich, dass ~10% der CRF positiven Neurone der Ghrelin-Gruppe und ~22% der CRF-Neurone der 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin + 8  $\mu\text{g}$  Bombesin-Gruppe auch Fos positiv waren. Im Gegensatz dazu zeigten in der 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin + 4  $\mu\text{g}$  Bombesin-Gruppe nur ~2% der CRF haltigen Neurone eine Fos-Expression, weniger als in der Ghrelin-Gruppe. Auch in der reinen Kontrollgruppe zeigten nur ~2% der CRF positiven Neurone eine Fos-Immunreaktivität. Möglicherweise handelt es sich in der 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin + 4  $\mu\text{g}$  Bombesin-Gruppe um eine Fehlinjektion der Peptide, da der zu erwartende Ghrelineffekt nicht zu beobachten war. Bei der kleinen Anzahl der Versuchstiere ( $n = 3$ ) könnte bereits eine fehlerhaft ausgeführte Injektion zu einer starken Abweichung der Messwerte führen. Deshalb wäre es sinnvoll, das Experiment mit einer größeren Anzahl von Versuchstieren zu wiederholen, um den Einfluss möglicher Injektionsfehler auf die Auswertung der Ergebnisse zu minimieren.

---

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt bleiben die unterschiedlichen Effekte der 13 µg Ghrelin-Gruppe und der 13 µg Ghrelin + 4 µg Bombesin-Gruppe auf die Aktivierung CRF positiver Neurone deshalb unklar.

#### **4.8 Fazit**

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass der orexigene Effekt von peripherem Ghrelin bei ungesättigten Ratten durch die simultane Applikation von Bombesin gehemmt wird, während Amylin nicht in der Lage war, die Wirkung von peripherem Ghrelin zu beeinflussen. Die Bombesin induzierte Hemmung der orexigenen Effekte von Ghrelin geht einher mit einer signifikanten Steigerung der Fos-Expression in Neuronen des PVN. Fast 60% dieser Fos aktiven Neurone im PVN waren CRF positiv. Die Aktivierung von CRF positiven Neuronen könnte die Ursache für die Hemmung der Ghrelin induzierten Nahrungsaufnahme durch Bombesin sein.