



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck

-Direktor: Prof. Dr. med. Jens Marquardt-

**Akuter Einfluss von Leptin und Ghrelin auf den Glukose- und
Lipidstoffwechsel beim Menschen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von
Paul Martin Simon
aus Wolmirstedt

Lübeck 2021

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Friedhelm Sayk

2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Christian Sina

Tag der mündlichen Prüfung: 03.08.2021

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 03.08.2021

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vi
1 Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Grundlagen	1
1.1.1 Adipositas	1
1.1.2 Neuroendokrine Kontrolle der Energiehomöostase	2
1.2 Leptin und Ghrelin - Hormonelle Gegenspieler des Energiehaushalts	4
1.2.1 Leptin	4
1.2.1.1 Entdeckung des Proteins	4
1.2.1.2 Von der Sekretion zur Signalinduktion	5
1.2.1.3 Der Hypothalamus als zentrale Schaltstelle der Nahrungsregulierung	6
1.2.1.4 ZNS-vermittelte und direkte zelluläre Wirkung auf den Fettstoffwechsel	7
1.2.1.5 Auswirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel	10
1.2.1.6 Intranasale Applikationsform	12
1.2.2 Ghrelin	12
1.2.2.1 Struktur und Metabolismus	13
1.2.2.2 Vorkommen und Regulation	13
1.2.2.3 Rezeptor	14
1.2.2.4 Orexigene Wirkungen	14
1.2.2.5 Periphere Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel	15
1.2.2.6 Periphere Auswirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel	16
1.2.3 Ziel der vorliegenden Arbeit	16
1.2.4 Fragestellung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Studiendesign	19
2.2 Auswahl der Probanden	21
2.3 Versuchsvorbereitung und Anlage der Messgeräte	21

2.4	Versuchsprotokolle	22
2.4.1	Leptinversuch	22
2.4.2	Ghrelinversuch	24
2.5	Spezielle Untersuchungen	24
2.5.1	Laboruntersuchungen	24
2.5.1.1	Leptinversuch	24
2.5.1.2	Ghrelinversuch	26
2.5.1.3	Analyse der Blutproben	26
2.5.2	Weitere Messverfahren im Rahmen weiterer Studienteile	26
2.6	Statistik	27
3	Ergebnisse	29
3.1	Anthropometrische Daten	29
3.2	Leptin	30
3.2.1	Serum-Leptinwerte	30
3.2.2	Ausgangswerte der Stoffwechselfparameter	31
3.2.3	Auswertungen im Versuchsablauf	31
3.2.4	Auswirkungen der intravenösen und intranasalen Gabe von Leptin auf den Fettstoffwechsel	33
3.2.5	Auswirkungen der intravenösen und intranasalen Gabe von Leptin auf den Glukosestoffwechsel	34
3.2.6	ACTH, Kortisol und Katecholamine	36
3.3	Ghrelin	38
3.3.1	Serum-Ghrelinwerte	38
3.3.2	Ausgangswerte der Stoffwechselfparameter	39
3.3.3	Statistische Auswertung	39
3.3.4	Auswirkungen der intravenösen Gabe von Ghrelin auf den Fettstoffwechsel	40
3.3.5	Auswirkungen der intravenösen Gabe von Ghrelin auf den Glukosestoffwechsel	42
3.3.6	ACTH, GH, Kortisol und Katecholamine	43
3.4	HOMA-Index	46
3.5	Synopsis	47
4	Diskussion	48
4.1	Leptin, Ghrelin und Energiehomöostase	48
4.2	Leptin	49
4.2.1	Leptinspiegel im Versuch	49
4.2.2	Akute Effekte auf die Lipolyse	50

4.2.3	Akute Effekte auf den Glukosestoffwechsel	51
4.3	Ghrelin	52
4.3.1	Ghrelinspiegel im Versuch	52
4.3.2	Akute Effekte auf die Lipolyse	52
4.3.3	Akute Effekte auf den Glukosestoffwechsel	53
4.4	Synopsis der Leptin- und Ghrelinstudie	54
4.5	Limitationen	55
4.6	Ausblick	56
4.7	Beantwortung der Fragestellung	57
5	Zusammenfassung	59
6	Literaturverzeichnis	61
7	Anhang	78
7.1	Materialien und Substanzen	78
7.2	Ethikvotum	80
8	Danksagungen	81
9	Lebenslauf	82

Abkürzungsverzeichnis

BMI	Body-Mass Index
ZNS	zentrales Nervensystem
MC3/4Rs	Melanokortin-3 und -4 Rezeptoren
BRT	Baroreflextest
MSNA	muscle sympathetic nerve activity
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
KG	Körpergewicht
MR	molar ratio
R_a	plasma rate of appearance
HPLC	high performance liquid chromatography
BRR	Barorezeptorreflex
ARC	Nucleus arcuatus
NPY	Neuropeptid Y
AgRP	Agouti-related protein
POMC	Proopiomelanocortin
CART	peptide cocaine and amphetamine-related transcript
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
HSL	hormonsensitive Lipase
FFA	freie Fettsäuren
HDL	High Density Lipoproteine
TAG	Triacylglyceride

rhLeptin	rekombinantes humanes Leptin
GSH-R	growth hormone secretagogue receptor
GH	growth hormone
GHRH	Growth hormone releasing hormone
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
GOAT	Ghrelin O-Acyltransferase
HOMA	Homeostasis Model Assessment
i.v.	intravenös
i.n.	intranasal

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Grundlagen

1.1.1 Adipositas

Adipositas, aktuell eine der weltweit tiefgreifenden gesundheitlichen Probleme in der menschlichen Bevölkerung, rückt von Jahrzehnt zu Jahrzehnt immer mehr in den Brennpunkt zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen. Schätzungsweise sind derzeit mehr als eine Milliarde Erwachsene und 10 % aller Kinder von Übergewicht bzw. Adipositas betroffen [62]. In Deutschland sind nach Daten einer von 2008 bis 2011 durchgeführten Studie des Robert-Koch-Instituts 67 % der Männer und 53 % der Frauen übergewichtig.

Adipositas wird gemäß Leitlinien der Deutschen Adipositas-Gesellschaft als eine über das Normalmaß hinausgehende Vermehrung des Körperfetts bezeichnet und mit Hilfe des Body-Mass Index (BMI) eingeteilt. Die Berechnungsgrundlage bildet die Formel

$$\frac{\text{Körpergewicht in kg}}{(\text{Körperlänge in m})^2}.$$

Ab einem BMI von $25 \frac{\text{kg}}{\text{m}^2}$ wird per definitionem von Übergewicht, ab einem BMI von $30 \frac{\text{kg}}{\text{m}^2}$ von Adipositas gesprochen.

Morbidität und Mortalität verschiedener Erkrankungen sind bei fettleibigen Menschen deutlich erhöht. Insbesondere das intraabdominelle viszerale Fettgewebe prädestiniert zur Entstehung etlicher Grunderkrankungen wie der primären arteriellen Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2 und Hyperlipidämie. Arteriosklerose mit Myokardinfarkt und apoplektischem Insult können drastische Komplikationen darstellen [51, 57, 86]. Aber auch Malignome, Osteoarthrose oder Depression sind mit einem erhöhten BMI assoziiert [75, 85]. Mit dem Wissen um diese pathologischen Folgeerscheinungen wird aus medizinischer Sicht umso eindrucklicher deutlich, wie wichtig es ist, ein Gesamtverständnis für die Ursachen und Entwicklung der Adipositas zu bilden. In Zukunft könnten so Schlüsselstellen identifiziert werden, die als Angriffspunkte therapeutischer

Maßnahmen dienen könnten, mit dem Ziel die Prävalenz der Adipositas-assoziierten Komorbidität zu senken.

1.1.2 Neuroendokrine Kontrolle der Energiehomöostase

Physiologischerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen der Nahrungsaufnahme und dem Energieverbrauch. Dieser als Energiehomöostase (griechisch: *homoiostásis* „Gleichstand“) bezeichnete Zustand ist bei Adipositas im Sinne einer relativen Erhöhung der Energiezufuhr gestört. Dem Ungleichgewicht liegen zahlreiche Faktoren zu Grunde. Zu den wichtigsten gehören Lebensgewohnheiten (zunehmende Bewegungsinaktivität, fettreiche Ernährung), Umwelteinflüsse, genetische, soziale sowie kulturelle Faktoren.

Zur Aufrechterhaltung der Homöostase hat sich ein hochkomplexes neuroendokrines System mit einer Vielzahl redundanter Signalfade und Botenstoffen entwickelt. Das System soll die Auswirkungen kurzzeitiger Fluktuationen im Energiehaushalt abfedern [152]. Eine beständige bidirektionale Kommunikation zwischen Körperperipherie und zentralem Nervensystem sorgt dafür, dass die Energiereserven im Körper sichergestellt werden. Die zentrale Erfassung von Glukose- und Fettvorräten liefert Auskunft über die kurz- und langfristigen Energiespeicher. Das Gehirn ist dabei auf die Informationen von Hormonen angewiesen, um sich ein aktuelles Bild über Nährstoffreserven zu verschaffen. Je nach energetischer Abweichung können auf dieser Basis appetitanregende (orexigene) oder appetitzügelnde (anorexigene) Mechanismen eingeleitet werden.

Die vorliegende Promotionsarbeit basiert auf zwei Studien, in denen die metabolischen Effekte von Leptin (Studie a) als anorexigenes Hormon und Ghrelin (Studie b) als orexigenes Hormon untersucht wurden. Beide Hormone sind jeweils Bestandteil eines Regelkreises, in dem das zentrale Nervensystem, insbesondere der Hypothalamus, die Steuerzentrale zur Aufrechterhaltung der Energiehomöostase darstellt. Beide Studien stehen im Kontext mit weiteren Studien. Diese fokussieren sich jeweils auf die sympathisch vermittelte Blutdruckregulation über den Baroreflex unter Leptin- bzw. Ghrelingabe [88, 94].

Leptin informiert das zentrale Nervensystem (ZNS) über die Masse an weißem Fettgewebe, welches als Energiespeicher des Körpers angesehen werden kann. Ein hoher Leptinspiegel im Blut signalisiert somit einen Energieüberschuss, welchem durch die zentralnervöse Einleitung metabolischer und appetitzügelnder Mechanismen entgegengesteuert wird. Auf kataboler Seite wird der Glukosemetabolismus und - über Anhebung des Sympathikotonus - die Lipolyse im peripheren Gewebe gesteigert. Zusätzlich zum Regelkreis hat Leptin auch direkt zelluläre Wirkungen auf die Lipolyse im peripheren Fettgewebe. Leptin hat folglich sowohl zentralnervös als auch direkt zellulär,

also auf zwei verschiedenen Ebenen einen Einfluss auf die Regulation der Energiehomöostase (siehe 1.1). Der Ghrelin Spiegel im Blut hingegen steigt bei leerem Magen. Dem ZNS wird ein Mangel an Energie signalisiert. Um das Energiegleichgewicht wieder herzustellen, werden zentralnervös der Appetit stimuliert und metabolisch-anabole Wirkungen induziert. Letzteres erfolgt über die Erhöhung der Lipogenese im weißen Fettgewebe und die Anhebung des Blutzuckerspiegels (siehe 1.2).

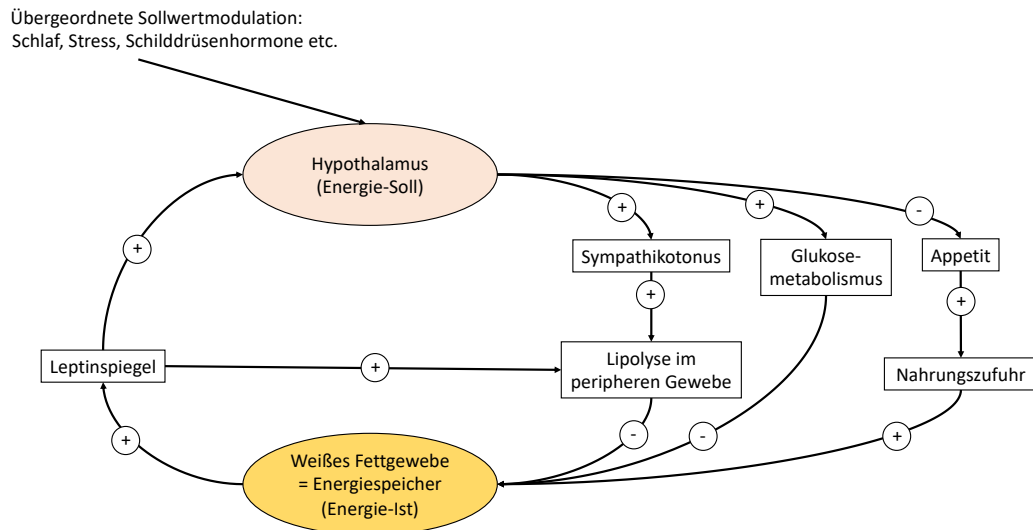


Abb. 1.1: Regelkreis Leptin und Energiehomöostase. Leptin wird proportional zur Fettgewebsmasse im weißen Fettgewebe gebildet und sezerniert. Leptin zirkuliert im Blut und führt über die Bindung an hypothalamische Leptinrezeptoren zu einer anorexigenen Antwort. Zudem werden der Glukosemetabolismus und die Lipolyse im peripheren Fettgewebe stimuliert. Die Anregung der Lipolyse erfolgt zusätzlich über direkt zelluläre Mechanismen. Das Ziel der zentralnervösen und direkten Leptineffekte ist die Wiederaufrichtung der Balance zwischen Energieverbrauch und -aufnahme.

In der vorliegenden Dissertation werden zwei Hormone gegenübergestellt, die sich in ihrer Wirkung auf die Nährstoffaufnahme und die Energieverwertung funktionell gegenüberstehen und folglich einen gegensätzlichen Einfluss auf den Energiehaushalt ausüben. Die Studie wird sich auf die akuten Hormoneffekte, d.h. die kurzzeitigen Auswirkungen (Minuten bis wenige Stunden nach Bolusgabe der Substanz) supraphysiologischer Hormonspiegel im Blut bei jungen, schlanken gesunden Probanden konzentrieren. So können etliche Hypothesen überprüft werden, die aus Tiermodellen abgeleitet wurden.

Bei vielen Untersuchungen an männlichen Probanden wurde sich für die subkutane Applikationsform entschieden [66, 149]. Daraus ergibt sich eine langsame und verlängerte Freisetzung des Hormons. Durch die im Rahmen dieser Arbeit gewählte Kombination aus intravenöser Gabe und supraphysiologischen Spiegel hingegen ist ein klareres Bild

1.2. Leptin und Ghrelin - Hormonelle Gegenspieler des Energiehaushalts

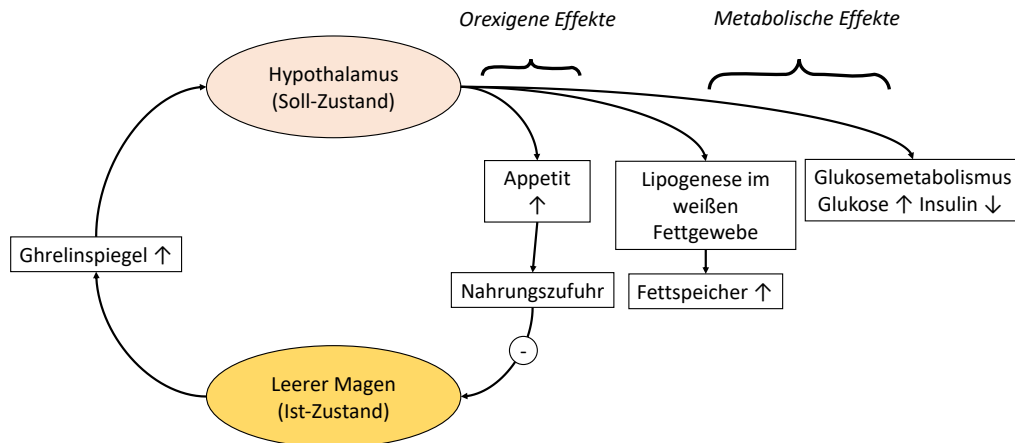


Abb. 1.2: Regelkreis Ghrelin und Energiehomöostase. Die Ghrelinfreisetzung erfolgt aus dem leeren Magen. Die Verarbeitung der Information eines erhöhten Ghrelinspiegels findet auf zentralnervöser Ebene im Hypothalamus statt. Der Regelkreis schließt sich über die Stimulation des Appetits und der Erhöhung der Nahrungszufuhr durch eine negative Rückkopplung. Darüber hinaus werden die Lipogenese im weißen Fettgewebe angeregt und der Glukosespiegel im Blut erhöht.

über die metabolischen Effekte gerade in der Akutphase zu erwarten. Darüber hinaus weisen die meisten übergewichtigen Menschen infolge einer Leptinresistenz einen erhöhten Leptinspiegel auf [50]. Der gestörte Hormonstatus wird durch die verwendeten supraphysiologischen Spiegel simuliert. In der vorliegenden Studie sollen zunächst die Wirkmechanismen bei gesunden Probanden geklärt werden. Im Anschluss kann das Design in Folgestudien auf ein Kollektiv adipöser Probanden mit interferierender Komorbidität übertragen werden.

1.2 Leptin und Ghrelin - Hormonelle Gegenspieler des Energiehaushalts

1.2.1 Leptin

1.2.1.1 Entdeckung des Proteins

1950 wurde bei Mäusen mit kongenitaler Fettleibigkeit ein genetischer Defekt identifiziert, der ein bis zwei Monate nach Geburt der Versuchstiere zu einer massiven Gewichtszunahme führte. Die Mutation ist seitdem mit dem Namen „ob“ als Symbol für „obese“ (englisch für fettleibig) versehen worden [72]. Mäuse mit einer homozygoten

1.2. Leptin und Ghrelin - Hormonelle Gegenspieler des Energiehaushalts

Mutation (ob/ob) fielen nicht nur wegen des extremen Übergewichts auf. Auch andere Pathologien wie Unfruchtbarkeit, Hyperphagie und Typ 2 Diabetes mellitus wurden an den Tieren beobachtet [76].

Mehr als 40 Jahre später konnte erstmals die molekulare Struktur des Proteins, das vom humanen OB-Gen kodiert wird, von der Forschungsgruppe um Jeffrey Friedman beschrieben werden [156]. Dieses Protein, welches aus 167 Aminosäuren und einem 21 Aminosäuren umfassenden Signalpeptid besteht, wurde fortan als Leptin bezeichnet. Leptin ist dem griechischem Wort „leptos“ entlehnt und kann mit dünn übersetzt werden. Eine dauerhafte Behandlung der ob/ob-Mäuse mit Leptin führt zu einer Reduktion der Nahrungszufuhr, des Körpergewichts und der Fettmasse sowie einer Erhöhung des Energieverbrauchs (zusammengefasst in [71]). Leptin spielt zudem eine wichtige Rolle in der Regulation einer Reihe physiologischer Prozesse im Zusammenhang mit der sympathischen Blutdruckregulation, der Ossifikation, der Immunabwehr und der Hämatopoese sowie in der Pubertät [35, 44, 138]. In der vorliegenden Arbeit werden akute Effekte von Leptin auf den systemischen Fettstoffwechsel und den Glukosemetabolismus untersucht.

1.2.1.2 Von der Sekretion zur Signalinduktion

Die Sekretion von Leptin unterliegt einem zirkadianen Rhythmus. Zwischen Mitternacht und dem frühen Morgen konnten die höchsten Leptinspiegel im Blut ermittelt werden, im weiteren Tagesverlauf die niedrigsten. Die Differenz zwischen Spiegelmaximum und -minimum ist gering ausgeprägt [104].

Das Hormon wird überwiegend vom weißen Fettgewebe in direkter Proportion zur Gesamtfettmasse in die Blutbahn sezerniert [96]. Es zeigt sich daher eine positive Korrelation der Leptinkonzentration im Blut zum BMI und zum Körperfettanteil [95]. Der Leptinspiegel ist somit ein Surrogatparameter für die Körperfettmasse und informiert ZNS-Strukturen, welche das Nahrungsverhalten steuern, über die Körperenergiesituation. Eine anhaltend überschießende Energieaufnahme kann konsekutiv über eine negative Rückkopplung gedrosselt werden. Bei adipösen Menschen ergeben sich erhöhte Leptinwerte laut Klein et al. zum einen aus einer gesteigerten Leptinproduktion pro Fettgewebseinheit und zum anderen aus einer größeren leptinproduzierenden Gesamtmasse an Adipozyten [79].

Leptin zirkuliert im Plasma als freie Form oder gebunden an ein Leptin-bindendes Protein [69]. Eine Interaktion mit peripheren Gewebsrezeptoren führt zur Einleitung verschiedener Prozesse, auf die noch detaillierter eingegangen werden soll. Im Gehirn entfaltet Leptin seine Wirkungen in verschiedenen Regionen. Die größte Dichte an Lep-

1.2. Leptin und Ghrelin - Hormonelle Gegenspieler des Energiehaushalts

tinrezeptoren weist der Hypothalamus auf. Hier werden die anorexigenen, katabolen Wirkungen des Leptins vermittelt. Die Wirkung von Leptin wird durch die Bindung an spezifische Rezeptoren (ObR a-f oder LEPR), welche im zentralnervösen und peripheren Gewebe exprimiert werden, vermittelt [24, 77, 139]. In Abhängigkeit von der Länge der intrazellulären Domäne werden die verschiedenen Isomere des ObR in Kurzform- oder Langformrezeptoren klassifiziert [114]. Der Langformrezeptor, ObRb, kommt gehäuft im Hypothalamus vor. Einigen Kurzformen des Leptinrezeptors (ObRa, ObRc) wird eine Modulationsrolle beim Transport von Leptin über die Blut-Hirn-Schranke zugeschrieben, denn diese Rezeptoren werden vor allem in den zerebralen Mikrogefäßen und dem Choroidplexus verstärkt exprimiert [13, 19]. Die grundlegenden zellulären Transduktionswege werden nicht dargelegt, da Humanexperimente wie in der vorliegenden Arbeit solche Mechanismen naturgemäß nicht untersuchen können.

1.2.1.3 Der Hypothalamus als zentrale Schaltstelle der Nahrungsregulierung

Der Hypothalamus stellt das wichtigste Steuerorgan vegetativer Funktionen dar. Neben der Aufrechterhaltung etlicher Homöostasesysteme, wie Temperatur- oder Osmolaritätsregulierung, sowie Steuerung des Sexualverhaltens, spielt er auch eine zentrale Rolle in der Regulierung der Nahrungsaufnahme (zusammengefasst in [57]).

Der Hypothalamus weist mehrere Kerngebiete auf, von denen der Nucleus arcuatus (ARC) die Region darstellt, in der Leptin im Wesentlichen seine Wirkungen entfaltet [59]. Die Regulation des Essverhaltens erfolgt - wie in Abbildung 1.3 veranschaulicht - im ARC über zwei konträre Klassen von Neuronen, welche jeweils mit einer hohen Dichte von Leptinrezeptoren versehen sind. Gesteigerte Nahrungszufuhr hemmt über die gesteigerte Ausschüttung von Leptin aus dem Fettgewebe die Produktion der anabolen/orexigenen Peptide Neuropeptid Y (NPY) und Agouti-related protein (AgRP), wodurch die Nahrungsaufnahme reduziert und der Energieverbrauch erhöht wird [30]. Umgekehrt stimuliert Leptin die Produktion von anorexigenen und katabol wirkenden Peptidhormonen wie Proopiomelanocortin (POMC) und peptide cocaine and amphetamine-related transcript (CART) [16]. Das Prohormon POMC wird in Adrenocorticotropes Hormon (ACTH), γ -MSH (Melanozyten-stimulierendes Hormon) sowie β -Lipotropin gespalten. Aus ACTH leitet sich das Spaltprodukt Melanotropin *alpha*-MSH (Melanozyten-stimulierendes Hormon) ab, welches in verschiedenen Regionen des ZNS an die Melanokortin-3 und -4 Rezeptoren (MC3/4Rs) bindet und für die katabole Wirkung verantwortlich ist [31]. Die Bedeutung dieses Signalwegs wird bei Menschen und Versuchstieren ersichtlich, die einen Mangel an POMC oder des MC3/4Rs aufweisen. Bereits in den ersten Jahren entwickeln sich schwere Essstörungen und eine starke Adipositas [45].

1.2. Leptin und Ghrelin - Hormonelle Gegenspieler des Energiehaushalts

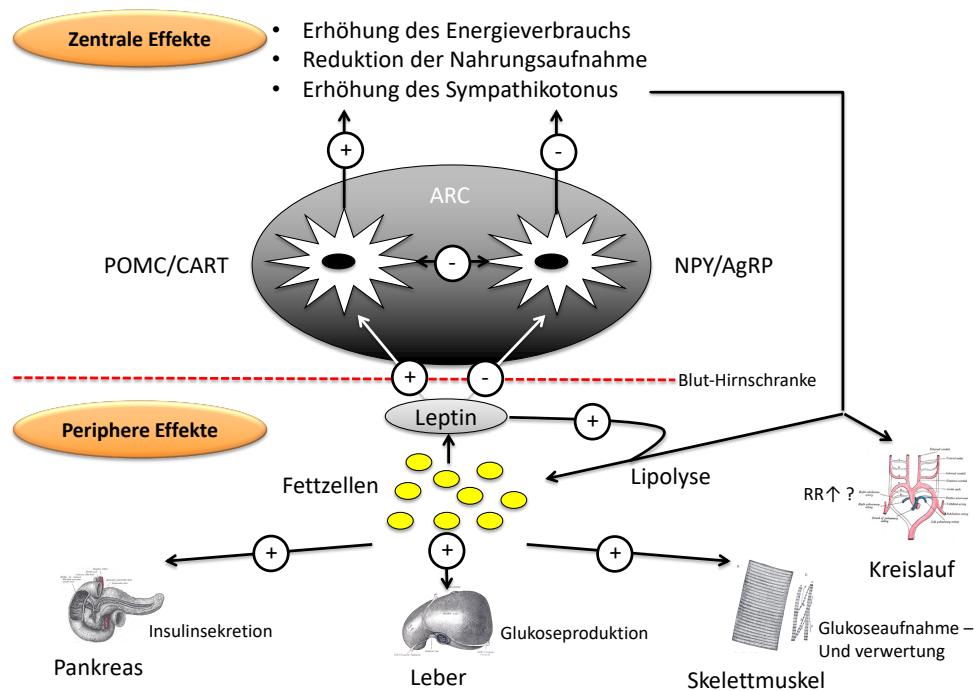


Abb. 1.3: Zentrale und periphere Leptineffekte auf den Metabolismus. Mit Hilfe des Leptin werden Informationen zum peripheren Fettspeicher durch Neuronen in spezifischen hypothalamischen Kerngebieten integriert und verarbeitet, wodurch die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase gewährleistet werden kann. Zudem stellt Leptin ein wichtiges Glied im Kohlenhydratstoffwechsel dar. POMC: Proopiomelanocortin; CART: peptide cocaine and amphetamine-related transcript; NPY: Neuropeptid Y; AgRP: Agouti-related protein; ARC: arcuate nucleus; MSNA: Muscle Sympathetic Nerve Activity. Die Abbildung orientiert sich an einer Vorlage von Meier et al. [99]. Die anatomischen Bilder entstammen Gray's Anatomy, 1918.

1.2.1.4 ZNS-vermittelte und direkte zelluläre Wirkung auf den Fettstoffwechsel

Die Lipolyse bezeichnet den Vorgang der hydrolytischen Spaltung von Triglyceriden in Glycerol und drei freie Fettsäuren. Am Fettabbau sind eine Reihe von Lipasen beteiligt. Die Adipozyten-Triglycerid-Lipase fungiert als Initiatorenzym und spaltet die erste Fettsäure vom Triglycerid ab. Komplettiert wird die vollständige Lipolyse durch die Enzyme hormonsensitive Lipase (HSL) sowie - im letzten Schritt - Monoglyceridlipase [17].

Die Lipolyse kann sowohl zentralnervös als auch direkt zellulär vermittelt werden. Zentral wirkt Leptin im Hypothalamus durch Aktivierung des MC3/4Rs (siehe Unterabschnitt 1.2.1.3). Es folgt eine Erhöhung des Sympathikotonus mit peripherer Aktivierung der Lipolyse durch die beiden Katecholamine Adrenalin und - in geringerer

1.2. Leptin und Ghrelin - Hormonelle Gegenspieler des Energiehaushalts

Ausprägung - Noradrenalin [16, 120]. Youngstrom und Bratens erbrachten vor fast 25 Jahren erstmals den anatomischen Beweis, dass das weiße Fettgewebe direkt vom sympathischen Nervensystem innerviert wird [155]. Die Katecholamine aktivieren β_1 -, β_2 - und β_3 -Adrenozeptoren, welche sich auf der Zellmembran der Adipozyten befinden. Die resultierende Aktivierung des cAMP-Systems hat die Phosphorylierung der HSL und damit einhergehend die Stimulation der Lipolyse zur Folge [89].

Frühbeck et al. haben 1997 an Mausadipozyten erstmals aufzeigen können, dass eine experimentell induzierte Hyperleptinämie zusätzlich über parakrine oder autokrine Modi signifikante Erhöhungen der Lipolyseaktivität erzielt [52]. Die Studie ließ den Schluss zu, dass Leptin-vermittelte Fettabbauprozesse nicht allein von zentralen Regulationmechanismen abhängig sind.

Daher stellt sich die Frage, welche biochemischen Auswirkungen die Interaktion zwischen Leptin und den peripheren Gewebsrezeptoren auslöst. Das Hormon scheint den Fettstoffwechsel zu beeinflussen, indem die Expressionsrate spezifischer Enzyme verändert wird. Eine Schlüsselposition nimmt hierbei die periphere AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ein. Sie fungiert als metabolisches Steuerelement bei Veränderungen des energetischen Status einer Zelle. AMPK senkt die Fettsäure-, Triglycerid- und Sterolsynthese und steigert die β -Oxidation sowie die Ketogenese [150]. So wird beispielsweise in Adipozyten die Expression der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), einem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym in der Synthese langkettiger Fettsäuren und folglich der Lipogenese, durch AMPK inhibiert (siehe 1.4) [9].

Die Aktivität der peripheren AMPK wird durch Leptin gesteigert. In einem Mausexperiment wurde eine biphasische Aktivierung nachgewiesen, ein frühzeitiger AMPK-Gipfel nach 15 Minuten sowie ein verzögerter AMPK-Gipfel nach 6 Stunden [102]. Der frühe Gipfel wurde durch direkte periphere, der späte Gipfel durch hypothalamisch-sympathisch generierte Leptineffekte erklärt. Im Gegensatz dazu steht die Erkenntnis der vorliegenden Gesamtstudie, in der gezeigt wurde, dass bei Menschen im Untersuchungszeitraum von 2,5 Stunden nach intravenöser Leptingabe eine ZNS-Wirkung erfolgt [94]. Die zu beobachtenden Effekte können somit sowohl auf die direkte zelluläre als auch auf die zentralnervös-vermittelte Leptinwirkung zurückgeführt werden.

Ein Tierversuch der Forschungsgruppe um Sarmiento ließ erkennen, dass nicht nur die Produktion lipogenetischer Enzyme im weißen Fettgewebe gehemmt, sondern auch die mRNA-Expression einiger lipolytischer Proteine, darunter das Schlüsselenzym HSL oder die Lipoproteinlipase, stimuliert werden [128]. Eine Entleerung der Triacylglyceridspeicher nach Leptinapplikation konnte ebenfalls in der Leber, im Pankreas und im Skelettmuskel beobachtet werden. [134].

1.2. Leptin und Ghrelin - Hormonelle Gegenspieler des Energiehaushalts

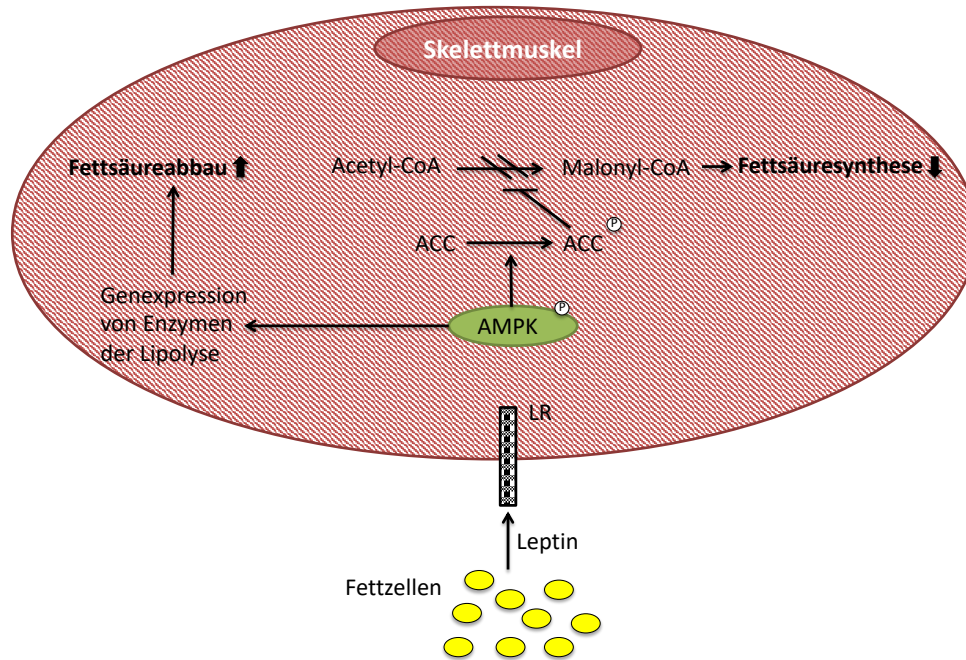


Abb. 1.4: Biochemische Effekte im Skelettmuskel. Eine Aktivierung des peripheren Leptinrezeptors führt über Phosphorylierungskaskaden zu lipidmetabolischen Veränderungen. AMPK: AMP-dependent kinase; P: Phosphorylierung; ACC: Acetyl-CoA-Carboxylase; LR: Leptinrezeptor. vgl. [55]

Üblicherweise erhöht sich nach längerer Zeit des Fastens der Plasmaspiegel von Lipidabbauprodukten wie freie Fettsäuren (FFA) infolge einer erhöhten Lipolyserate. Interessanterweise haben *in vivo* Studien an Ratten gezeigt, dass die Leptin-induzierte Lipolyse ohne Erhöhung der Plasma-FFA einhergeht [134]. Es wird vermutet, dass Triacylglyceride (TAG) zu Acetyl-CoA oxidiert werden, ohne in die Blutbahn zu gelangen [10].

Hwa et al. haben in einer Studie an ob/ob Mäusen herausfinden können, dass der respiratorische Quotient, welcher Aussagen über die Zusammensetzung der verstoffwechselten Substrate zulässt, nach Leptingabe abnimmt (von 0,99 auf 0,87). Somit erhöht Leptin nicht nur die Lipolyserate per se, sondern verschiebt auch das Abbauverhältnis der Nährstoffe zugunsten der Lipide [71].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Leptineffekte auf den Lipidmetabolismus sowohl direkt auf peripherer zellulärer Ebene als auch indirekt, d.h. auf hypothalamischer Ebene über eine Erhöhung des Sympathikotonus und eine Änderung des Nahrungsverhaltens erzielt werden.

Die aktuelle Studienlage bezüglich der akuten Effekte basiert größtenteils auf Tier- oder Zellkulturversuchen. Beim Menschen gibt es vorwiegend Studien zu Individuen

1.2. Leptin und Ghrelin - Hormonelle Gegenspieler des Energiehaushalts

mit genetischen oder erworbenen Erkrankungen wie kongenitaler Leptindefizienz oder Adipositas.

Weiterhin richteten sich die Beobachtungen der meisten klinischen Studien auf langfristige Effekte. Messungen von Metabolismusindikatoren direkt nach Bolusgabe bei ansonsten gesunden Probanden, wie sie im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführt wurden, könnten zum besseren Verständnis für akute regulatorische Veränderungen beitragen. Ein sehr ähnliches Probandenkollektiv wurde lediglich in einem Experiment der Arbeitsgruppe um Wolsk et al. gewählt. Das in der Studie via intravenöser Infusion applizierte Leptin ließ den Schluss zu, dass Leptin vermutlich über die Aktivierung von AMPK und STAT3 eine Steigerung der Lipolyse im Skelettmuskel bewirkt [151].

1.2.1.5 Auswirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel

Verschiedene Studien zeigen, dass Leptin sowohl über systemische als auch intrazerebrale Applikation eine Erhöhung der Insulinsensitivität und eine Erniedrigung des Glukosespiegels im Blut ausübt.

Im Folgenden wird die derzeitige Studienlage zur Insulin-Leptin-Wechselwirkung dargestellt. Der endokrine, insulinproduzierende Anteil des Pankreas ist einer der Hauptsteuerelemente des Glukosemetabolismus'. Zur Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase ist es durchaus sinnvoll, dass sich das pankreatische anabole Hormon Insulin und das katabole Adipokin Leptin gegenseitig beeinflussen. Hyperinsulinämie führt langfristig zu einer Erhöhung der Expression des Leptingens in Adipozyten und zum Anstieg der Leptinkonzentration im Blut [84, 126]. Umgekehrt inhibiert Leptin die Genexpression von Insulin und die Glukose-stimulierte Insulinsekretion [27, 133]. Diese negative Rückkopplung bildet die Grundlage für die Entstehung einer adipo-insulinären Achse. Der Glukosespiegel kann somit in Abhängigkeit vom Ausmaß des Fettdepots beeinflusst werden. Leptindefiziente Mäuse fallen mit einer Hyperglykämie, einer Hyperinsulinämie und einer Insulinresistenz auf [142]. Es wurde gezeigt, dass auf den β -Zellen der Langerhans-Inseln die Langform des Leptinrezeptors, ObRb, exprimiert wird. Kieffer et al. fanden in einer Untersuchung an isolierten Inselzellen von ob/ob Mäusen heraus, dass sich nach Leptingabe die Öffnungswahrscheinlichkeit der ATP-sensitiven Kaliumkanäle in den Inselzellen erhöht mit der Folge einer verminderten Insulinsekretion [78]. Zudem liegen Studien vor, die eine Inhibition der Insulinsekretion auch über einen erhöhten Sympathikotonus darlegen [109, 115]. Eine Erhöhung der Insulinsensitivität konnte nach intrazerebroventrikuläre Verabreichung von Leptin an ob/ob - und insu-

1.2. Leptin und Ghrelin - Hormonelle Gegenspieler des Energiehaushalts

lindefizienten Tieren sowie nach subkutaner Leptingabe an leptindefizienten Menschen beobachtet werden [53, 81, 116].

In den nächsten Abschnitten wird die glukosespiegel-senkende Leptinwirkung beleuchtet. Eine Erniedrigung des Glukosespiegels nach systemischer Leptingabe wurde in einzelnen Studien an leptindefizienten Mäusen, welche mit Hyperglykämien auffielen, gezeigt [117, 132]. Die Glukosemessungen erfolgten mehrere Stunden bis Tage nach Substanzgabe und betrachteten somit die langfristigen Leptineffekte im Gegensatz zur vorliegenden Studie. In den ersten Stunden jedoch fand die o.g. Humanstudie um Wolsk et.al. nach peripherer Leptinapplikation keine signifikanten Veränderungen des Glukosespiegels [151]. Dass die intravenöse Leptingabe dennoch ZNS-wirksam ist, wurde in der vorliegenden Gesamtstudie gezeigt. Ein akute Hyperleptinämie führte zu einer signifikanten Steigerung der zentral generierten muskulären sympathischen Nervenaktivität [94].

Zentralnervös verabreichtes Leptin kann diversen Studien zufolge die Glukose- und Glucagonspiegel durch Mechanismen, die unabhängig von Insulin sind, senken. Die Abnahme der systemischen Glukose resultiert zum einen aus der Unterdrückung der hepatischen Glukoseproduktion. Zum anderen wird die periphere Glukoseaufnahme in den Skelettmuskel, das braune Fettgewebe sowie das Herzgewebe gefördert [32, 53, 101]. Die Stimulation der Glukoseaufnahme im Skelettmuskel erfolgt über die hypothalamisch - sympathische Achse. Sowohl die intravenöse als auch die intrazerebrale Leptingabe erhöht die Aktivität des sympathischen Nervensystems. Nach Sympathikusblockade konnte keine periphere Leptinwirkung beobachtet werden [42, 61, 63, 101]. Die Effekte werden dabei über einen β -adrenergen Mechanismus vermittelt [103].

Der zeitliche Verlauf scheint entscheidend für die Effekte von Leptin auf Insulin und auf den Glukosemetabolismus zu sein. Während die Gabe von Leptin sowohl kurz- als auch langfristig eine insulinsenkende Wirkung ausübt, wird die Glukoseproduktion, die periphere Glukoseaufnahme und die systemische Glukosekonzentration unmittelbar nach intravenöser Leptingabe nach bisherigen Studien nicht beeinflusst [46, 151]. Dennoch zeigt der auf das sympathische Nervensystem fokussierende Teil der vorliegende Gesamtstudie eine zentral generierte Sympathoexzitation nach i.v. Leptinapplikation. Da ein Teil der Leptinwirkungen über die hypothalamisch - sympathische Achse erklärt werden, können trotz der bisherigen Datenlage akute Auswirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel erwartet werden.

1.2.1.6 Intranasale Applikationsform

In dieser Studie sollten die systemische Leptinwirkung, simuliert durch die i.v.-Gabe, und die direkte zentralnervöse Komponente differenziert betrachtet werden. In zahlreichen Tierversuchen wurde festgestellt, dass intrazerebroventrikulär appliziertes Leptin verschiedene Auswirkungen auf den Organismus hat [23]. Allerdings ist die direkte intrazerebrale Injektion bei Probanden mit einem ethisch nicht vertretbaren Risiko verbunden. Born et al. haben bereits 2002 in einer Humanstudie den Nachweis erbracht, dass intranasal verabreichte Neuropeptide (Insulin, Melanocortin und Vasopressin) - unter Umgehung des Blutkreislaufes - innerhalb von 30 Minuten im Liquor zu finden waren. Dem direkten Transport ins Gehirn liegen verschiedene Pfade zu Grunde. Der Transport erfolgt hauptsächlich über den Nervus olfactorius und den Nervus trigeminus, sowohl über intra- als auch extrazelluläre Mechanismen [20,29]. Die zentralnervöse Anreicherung von Leptin nach intranasaler Gabe wurde in einem Rattenversuch belegt, wobei gleichzeitig eine Anflutung des Hormons im peripheren Kreislauf ausblieb [131]. Vor diesem Hintergrund sollten in der vorliegenden Studie mittels der nicht-invasiven intranasalen Methode Erkenntnisse über primär zerebrale Leptineffekte gewonnen werden. Direkte Auswirkungen auf periphere Effektororgane, wie sie nach intravenöser Gabe zu erwarten sind, dürften zu vernachlässigen sein, da eine nennenswerte mukosale Leptinresorption nicht anzunehmen ist. Umgekehrt können zentralnervöse Effekte nach intravenöser Leptingabe hingegen nicht ausgeschlossen werden, da die vorliegende Gesamtstudie Auswirkungen auf das sympathische Nervensystem gezeigt hat [94]. Leptin gelangt physiologisch von der peripheren Fettzelle über den Blutkreislauf an seine zentralnervösen Wirkorte, wie unter 1.2.1.2 ausgeführt. Eine weitere Bedeutung der intranasalen Applikation kann in der therapeutischen Anwendung gesehen werden. Adipöse Individuen zeigten eine erhöhte Resistenz von Leptinrezeptoren in der Bluthirnschranke, sodass die Informationsübertragung von im Blutkreislauf zirkulierendem Leptin zum Hypothalamus gestört ist [26, 131]. Die intranasale Leptingabe ermöglicht im Gegensatz zur intravenösen Verabreichung eine direkte Anflutung im ZNS unter Umgehung der Bluthirnschranke.

1.2.2 Ghrelin

Vor ca. 20 Jahren wurde Ghrelin von der Forschungsgruppe um Kojima et al. als acetyliertes 28-Aminosäuren-Peptid entdeckt und beschrieben. Der Wortstamm „ghre“ ist indogermanischen Ursprungs und kann mit „wachsen“ übersetzt werden. Die Übersetzung bezieht sich auf die Eigenschaft des Hormons, die Freisetzung von Wachstumshormonen (GH vom englischen growth hormones) zu stimulieren [67,82]. Ghrelin führt

1.2. Leptin und Ghrelin - Hormonelle Gegenspieler des Energiehaushalts

zu einer Erhöhung des Körpergewichts und steigert die Nahrungszufuhr durch Erhöhung des Appetits [112,137]. Immer mehr Daten weisen darauf hin, dass das Hormon eine bedeutende Rolle in der Regulierung der Energiehomöostase und des Stoffwechsels spielt. Auf letzteres wird der Schwerpunkt der Dissertation liegen. Ferner wird Ghrelin eine Rolle im sensorischen, reproduktiven, inflammatorischen, kardiovaskulärem und renalen System sowie eine anxiolytische Komponente zugeschrieben [48], [92].

1.2.2.1 Struktur und Metabolismus

Es existieren sowohl in Ratten als auch im Menschen zwei verschiedene im Blutplasma zirkulierende Ghrelinformen, die acetylierte und die nicht-acetylierte Form. Der Anteil von acetyliertem Ghrelin beläuft sich auf weniger als 10 % des gesamten Ghrelinspiegels im Blutplasma, den Hauptanteil stellt die nicht-acetylierte Form [127]. An der Aminosäure Ser 3 erfährt Ghrelin postsynthetisch eine Acetylierung mit n-Octansäure; eine Modifikation, die für die endokrine Aktivität von notwendiger Bedeutung ist [82]. Für die nicht acetylierte Form wurden bisher nur wenige Funktionen (antiproliferativ, kardioprotektiv) belegt [11, 28]. In unserer Studie haben wir uns für die Verwendung der acetylierten Form entschieden, um die endokrinen Funktionen von Ghrelin abzubilden. Zur Vereinfachung wird sich im nachfolgenden Text bei Verwendung des Begriffs Ghrelin stets auf die acetylierte Form bezogen.

Beim Abbau der endokrin aktiven Form entsteht wieder Des-Acyl-Ghrelin. Dieser Schritt wird durch das Enzym Lysophospholipase 1 katalysiert [129]. Im Blutplasma beträgt die Konzentration von n-octanoyl-Ghrelin 10-20 fmol/ml. Dieser Wert entspricht in etwa einem Zehntel des Gesamtghrelins, welches beide Formen einschließt (100-150fmol/l) [83]. Akamizu et al. zeigten in ihrer Studie zur Pharmakokinetik, dass die Halbwertszeiten von aktivem acetyliertem Ghrelin und totalem Ghrelin nach intravenöser Bolusgabe von acetyliertem Ghrelin 9-13 bzw. 27-31 Minuten betragen [2]. Die dreifach höhere Halbwertszeit des totalen Ghrelins im Vergleich zur endokrin aktiven Form verdeutlicht den raschen Abbau des acetylierten Ghrelins im Blutplasma.

1.2.2.2 Vorkommen und Regulation

Ghrelin wurde erstmals im Magengewebe von Ratten gefunden. Dieser Ort, insbesondere der Magenfundus, gilt bis heute als die größte Sekretionsquelle des Hormons. In Menschen stammen zwischen 60 % und 70 % des Serumghrelins aus dem Magen, wo es von speziellen endokrinen Zellen, den P/D1-Zellen, produziert und in den Blutkreislauf sezerniert wird [6,48]. In niedrigeren Konzentrationen konnte Ghrelin auch in anderen peripheren Geweben (Niere, Pankreas, Ovarien, Gastrointestinaltrakt, Neben-

1.2. Leptin und Ghrelin - Hormonelle Gegenspieler des Energiehaushalts

nierenrinde) identifiziert werden [36, 38, 54, 82, 105, 141]. Im Gehirn wurde das Hormon hauptsächlich im ARC, in der Hypophyse sowie in der Nähe des dritten Ventrikels lokalisiert [33, 82, 87].

Die Freisetzung von Ghrelin wird von zahlreichen Faktoren bestimmt. Es besteht eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Ghrelinsekretion und Nahrungsverhalten bzw. dem Ernährungszustand. Während die Plasmakonzentration beim Fasten und kurz vor Mahlzeiten stark ansteigt, kommt es zu einem rapiden postprandialen Abfall innerhalb einer Stunde nach Nahrungsaufnahme [34]. Zudem bestehen negative Korrelationen zwischen dem Plasmaspiegel von Ghrelin und dem Alter, dem BMI sowie den Plasmaspiegeln von Insulin und Glukose [4, 60, 80, 111, 121].

1.2.2.3 Rezeptor

Der Ghrelinrezeptor wurde bereits 1996, also vor Entdeckung des Peptidhormons und endogenen Liganden Ghrelin, beschrieben [70]. Es handelt sich dabei um einen *growth hormone secretagogue receptor (GSH-R)*, der v.a. durch seine Eigenschaft, die Sekretion von growth hormone (GH) stimulieren zu können, bekannt wurde. Bisher wurden zwei Formen des Ghrelinrezeptors beschrieben: Die Langform GHS-R1a sowie die funktional vermutlich inaktive Splicevariante GHS-R1b [98, 106]. GHS-R1a gehört zur Gruppe der G_q-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die Wirkung wird über eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels erzielt [106]. Zentral wird der GHS-R vornehmlich in der Adenohypophyse, im hypothalamischen ARC und im Hippocampus exprimiert, peripher im Gastrointestinaltrakt und in den Gonaden [58, 70, 80].

1.2.2.4 Orexigene Wirkungen

Die Regulation des Appetitverhaltens verläuft über zentrale Bahnen in den hypothalamischen Kerngebieten. Peripher appliziertes Ghrelin aktiviert über den Ghrelinrezeptor Zellen im ARC und im Nucleus paraventricularis [65, 125]. Wird Ghrelin vom Magen ins Blut sezerniert, kann es im Plasma an High Density Lipoproteine (HDL) binden [18]. Der weitere Transportweg vom peripheren zum zentralnervösen Gewebe erfolgt wahrscheinlich über gastrale Afferenzen des N. vagus. Sowohl die chirurgische als auch die pharmakologische Vagusblockade mit Capsaicin führten in einem Tierversuch zum Ausbleiben der ghrelininduzierten Effekte wie beispielsweise die Erhöhung der GH-Sekretion [37].

Auf hypothalamischer Ebene übt Ghrelin zu Leptin entgegengesetzte Effekte aus. So wird die Expression orexigener Peptide wie NPY und AgRP stimuliert und die Aus-

1.2. Leptin und Ghrelin - Hormonelle Gegenspieler des Energiehaushalts

schüttung von POMC inhibiert [33,74]. Infolgedessen wird der Energieverbrauch reduziert und die Nahrungsaufnahme gesteigert [135].

Eine Schlüsselstellung in der Appetitregulierung nimmt auf biochemischer Ebene das hypothalamische Enzym AMPK ein. Eine *in vivo* Applikation (intraperitoneal) von Ghrelin in Ratten erhöht die AMPK-Aktivität. Ghrelin greift dadurch in die Regulation des zentralnervösen Lipidmetabolismus ein: AMPK inhibiert die hypothalamische ACC, wodurch der Malonyl-CoA -Spiegel im Hypothalamus gesenkt und konsekutiv die Carnitin-Palmityltransferase stimuliert wird. Aktivierte Carnitin-Palmityltransferase beschleunigt die mitochondriale Fettsäureoxidation in hypothalamischen Neuronen [3, 90]. Vermutlich spielt das Uncoupled Protein 2 (UCP 2), welches die im Rahmen der β -Oxidation entstehenden freien Sauerstoffradikale neutralisiert, eine tragende Rolle für die orexigenen Ghrelineffekte. In UCP-defizienten Mäusen konnte nach exogener Ghrelinzufuhr kein Anstieg des zur Appetitstimulation beteiligten NPY beobachtet werden [5].

1.2.2.5 Periphere Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel

Ghrelin übt einen Einfluss auf die zentralnervöse Regulation des Fettstoffwechsels aus und ist zugleich einer der wichtigsten Modulatoren auf direkt zellulärer Ebene des Lipidmetabolismus in der Körperperipherie. Intrazerebroventrikuläre Ghrelininfusionen lösen lipogenetische Prozesse im peripheren weißen Fettgewebe aus, unabhängig von der orexigenen Wirkung auf das Nahrungsverhalten. Die mRNA-Expression lipogenetischer Enzyme (Lipoprotein Lipase, ACC, Fettsäuresynthase Stearoyl-CoA-Desaturase-1) werden durch zentrale Ghrelinapplikation gesteigert und die mRNA-Expression des lipolytischen Enzyms Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1A wird reduziert [140].

In-vitro-Studien an Rattenadipozyten haben gezeigt, dass beide Hauptformen des Ghrelins, acetyliertes und nicht-acetyliertes Ghrelin, einen anti-lipolytischen Effekt ausüben [100,107].

Die intravenöse Gabe von Ghrelin offenbart sehr widersprüchliche Ergebnisse. Vestergaard et. al. fanden in einer Humanstudie heraus, dass intravenös (i.v.) appliziertes Ghrelin einen Anstieg von Markern der Lipolyse bewirkt, sowohl der freien Fettsäuren im Blut als auch - jedoch nicht signifikant - des Glycerols im subkutanen Fettgewebe und im Sklettmuskel [144,145]. In einer anderen Humanstudie konnte ein Anstieg der Triglyceride im Blutplasma, als Marker der Lipogenese, nach intravenöser Ghrelinapplikation beobachtet werden. Allerdings erstreckte sich der Untersuchungszeitraum auf mehrere Tage und nicht wie in unserer Studie auf die Zeitpunkte unmittelbar nach Substanzgabe [68].

1.2.2.6 Periphere Auswirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel

Erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Ghrelin und Insulin gaben immunhistochemische und mRNA analytische Studien an Pankreaszellen. An verschiedenen pankreatischen Zelllinien, u.a. α -Zellen, β -Zellen und ε -Zellen, konnte die Expression von Ghrelin, das Enzym Ghrelin O-Acyltransferase (GOAT) sowie der GSH-R gezeigt werden [38, 118, 147, 153].

Die Auswirkungen von exogen zugeführtem Ghrelin auf den Glukosemetabolismus stehen vermutlich in Abhängigkeit von der Dauer der Einwirkung. Die Datenlage zur kurzzeitigen Effekten ist sehr uneinheitlich. In einem Versuch der Arbeitsgruppe um Vestergaard wurden keine signifikanten akuten Änderungen hinsichtlich des Insulin- und Glukosespiegels beobachtet [144]. In einer Studie von Broglio et al. jedoch steigt der Plasmaglukosespiegel, gefolgt von einer Hypoinsulinämie, mutmaßlich unabhängig von den GH-vermittelten Effekten [22, 108]. Die Arbeitsgruppe um Doi et al. fand heraus, dass Ghrelin die Expression von dem β -Zellautoantigen 1A-1 β fördert und auf diesem Weg die Glukose stimulierte Insulinsekretion hemmt [40].

Bei längerfristiger Gabe von Ghrelin steigt in den meisten Studien der Glukosespiegel im Blutplasma. Exemplarisch ist eine Studie an Mäusen um Nieminen et al. aufzuführen, in der über vier Tage intraperitoneal verabreichtes Ghrelin zu einem signifikanten Anstieg der Plasmaglukose führte [113]. Die Auswirkungen auf den Insulinspiegel hingegen sind aus der Zusammenschau der bisherigen Studienlage nicht eindeutig zu benennen. Während der Insulinspiegel in einer Mäusestudie um Asakawa et al. nach wiederholt intraperitonealer Ghrelingabe anstieg, konnten Barrazoni et al. nach subkutan verabreichtem Ghrelin keine Veränderungen des Plasmainsulins beobachten [1, 7, 15, 127, 143].

1.2.3 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig die akuten Auswirkungen von als i.v. und i.n. Bolus verabreichtem Leptin sowie als i.v. Bolus appliziertem Ghrelin auf die metabolischen Effektororgane im Vergleich zu einer Placebobedingung im Crossover-Design. Beide Hormone stellen wichtige Einflussgrößen auf die Energiehomöostase im menschlichen Körper dar. Ein Ungleichgewicht des Energiehaushalts kann auf lange Sicht zur Adipositas führen, welche weltweit eine der Hauptursachen für Morbidität und Tod darstellt.

1.2. Leptin und Ghrelin - Hormonelle Gegenspieler des Energiehaushalts

Die Dissertation besteht aus zwei inhaltlich ähnlichen Studien mit placebokontrollierten Kohorten. Aufgrund des vergleichbaren Studiendesigns ist eine Zusammenfassung und inhaltlich vergleichende Bewertung in einer Dissertation sinnvoll.

In der Literatur werden beiden Hormonen in ihrer Wirkung gegensätzliche Eigenschaften zugeschrieben (siehe Tabelle 3.7). Während Ghrelin einen stimulierenden Einfluss auf die Nahrungsaufnahme hat, wirkt Leptin anorexigen, also Appetit hemmend. Auf diese Weise tragen beide Hormone einen großen Teil zur Aufrechterhaltung der Energiehomöostase bei. In zahlreichen Studien wird die funktionell antagonistische Wirkung auch im Glukose- und Lipidmetabolismus bestätigt [80, 123]. Leptin stimuliert die Lipolyse und senkt den Glukosespiegel im Blut, wogegen Ghrelin die Lipolyse hemmt und den Glukosespiegel steigert. Allerdings beziehen sich die meisten Ergebnisse auf Langzeiteffekte und/oder Tiermodelle. Die Akuteffekte beim Menschen wurden bislang unzureichend beleuchtet und sind zum Teil widersprüchlich.

Die Arbeit soll einerseits mehr Klarheit zwischen den Unterschieden und Gemeinsamkeiten der beiden funktionellen Gegenspieler schaffen. Andererseits sollen die Unterschiede zwischen den kurz- und in der Literatur beschriebenen langfristigen Effekten auf die metabolischen Komponenten der Energiehomöostase näher beleuchtet werden.

1.2.4 Fragestellung

- Wirken Leptin und Ghrelin in der Akutphase gegensätzlich auf den Lipid- und Glukosestoffwechsel?
- Unterscheiden sich die Veränderungen der Akutphase von den in der Literatur beschriebenen langfristigen Veränderungen?

Tab. 1.1: Hormonelle Antagonisten im Vergleich

		Leptin	Ghrelin
Direkte Fettstoffwechseleffekte			
Lipolyse	akut	↑	↑
	chronisch	↑	↓
Direkte Glukosestoffwechseleffekte			
Glukosespiegel	akut	Uneinheitliche Daten	
	chronisch	↓	↑
Nahrungsaufnahme		↓	↑
Appetit		↓	↑
Energieverbrauch		↑	↓

2 Material und Methoden

Die vorliegende Dissertation setzt sich, wie einleitend geschildert, aus Bestandteilen zweier komplexer Versuchsreihen zusammen. Parallel zu den hier berichteten Untersuchungen des Fett- und Glukosemetabolismus erfolgten sowohl in der Ghrelin- als auch in der Leptinstudie mikroneurographische Untersuchungen der sympathikusvermittelten Blutdruckregulation über den Baroreflexbogen [88, 94]. Im Folgenden werden die Materialien und die Methoden aller Studienkomponenten erwähnt, um mögliche Interaktionen und Einschränkungen sichtbar zu machen. Dennoch wird der Schwerpunkt des Kapitels auf die zur Beantwortung der Fragestellung relevanten Methoden gerichtet sein.

Es handelt sich bei beiden Teilstudien um placebokontrollierte Kohortenstudien an jungen gesunden Probanden. In der einen Teilstudie wurde der Einfluss von Leptin (i.v. bzw. i.n.) vs. Placebo (i.v. bzw. i.n.), in der anderen von Ghrelin (i.v.) vs. Placebo (i.v.) untersucht. Methodisch unterschieden sich die Versuche lediglich im zeitlichen Ablauf (s.u.), um substanzspezifische Gegebenheiten optimal zu berücksichtigen. Der Gesamtkontext, das grundlegende Studiendesign, die Probandencharakteristik und die Versuchsvorbereitung sind vergleichbar. Daher erfolgt eine in weiten Teilen gemeinsame methodische Abhandlung. Die Ergebnisse unterliegen zwar einer separaten Auswertung, jedoch einer Synopsis und vergleichenden Interpretation hinsichtlich der übergeordneten Fragestellung in einer gemeinsamen Arbeit.

Den Studien geht ein gemeinsames Ethikvotum der Universität zu Lübeck voraus (Aktenzeichen 09-166).

2.1 Studiendesign

Die Studien folgten jeweils einem doppelverblindeten, placebokontrollierten, balancierten Crossover-Design (siehe Abbildung 2.1). Die Probanden nahmen im Mindestzeitabstand von vier Wochen an drei Sitzungen in der Leptinstudie und an zwei Sitzungen in der Ghrelinstudie teil. Den Teilnehmern im Leptinexperiment wurden entweder intravenös oder intranasal gewichtsadaptiert humanes Leptin oder physiologische Koch-

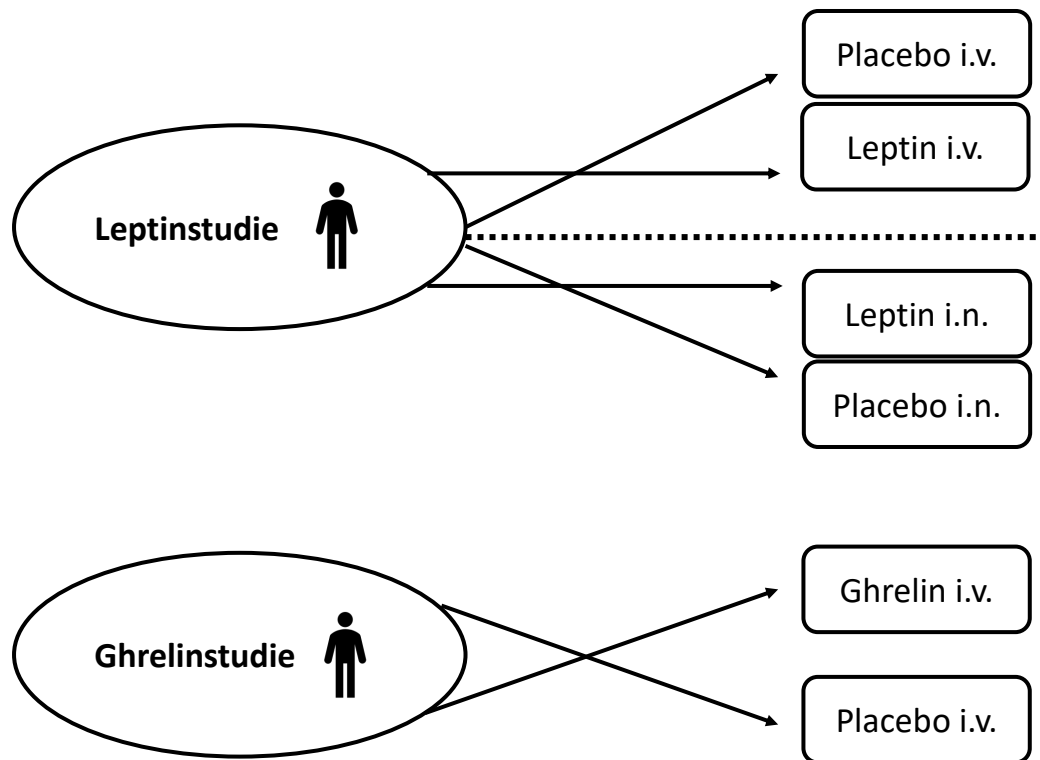


Abb. 2.1: Versuchsaufbau. Die Studien folgten einem Crossover-Design, wobei jungen, schlanken, männlichen Probanden entweder die hormonelle Substanz (Leptin: i.v. oder i.n.; Ghrelin: i.v.) oder isotone Kochsalzlösung als Placebosubstanz verabreicht wurden.

salzlösung als Placebosubstanz appliziert. Im Ghrelinexperiment erhielten die Studienteilnehmer entweder gewichtsadaptiert einen intravenösen Bolus des Hormons Ghrelin oder eine isotone Natriumchloridlösung als Placebosubstanz. Die Zuordnung der Versuchsbedingung zu den Versuchstagen erfolgte zufällig.

Als abhängige Variable gelten die Ergebnisse, die aus den Blutuntersuchungen, den neuropsychologischen Tests und weiteren Messverfahren gewonnen wurden. Auf die einzelnen Untersuchungsmethoden wird im weiteren Verlauf des Methodenteils näher eingegangen.

Alle Methoden sind an der Universität zu Lübeck etabliert.

2.2 Auswahl der Probanden

Das Probandenkollektiv, das in die Auswertung einbezogen wurde, umfasste jeweils zwölf männliche Teilnehmer. Im Rahmen eines persönlichen Treffens wurde jeder Proband im Vorfeld über den Verlauf und die Risiken der Studie aufgeklärt und einer gründlichen klinisch-internistischen Untersuchung unterzogen. Zudem erfolgte eine Blutentnahme mit Bestimmung von alkalischer Phosphatase, Laktatdehydrogenase, Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, Bilirubin, Elektrolyten, γ -Glutamyltransferase, Kreatinin, den Gerinnungsparametern und kleinem Blutbild. Alle Probanden stimmten schriftlich ihrer Teilnahme zu.

Für alle Probanden galten nachfolgende Einschlusskriterien:

- Männliches Geschlecht
- Alter: zwischen 18 und 38 Jahre
- BMI = Normgewicht (BMI 20-25 kg/m²)
- Regelmäßiger Tag-Nacht-Rhythmus in den 2 Wochen vor dem jeweiligen Versuchsbeginn, keine Schichtarbeit
- Keine bekannten psychiatrischen, neurologischen, kardiovaskulären, pulmonalen, endokrinologische und gastrointestinalen Erkrankungen
- Keine Erkrankungen, die mit einer Störung der Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse einhergehen
- Keine regelmäßige Medikamenteneinnahme
- Kein Alkohol-, Nikotin- oder Drogenabusus
- Keine pathologischen Abweichungen der ermittelten Blutwerte

2.3 Versuchsvorbereitung und Anlage der Messgeräte

Die Versuchsteilnehmer wurden instruiert, ab dem jeweiligen Vortag jeder Sitzung koffein- oder alkoholhaltigen Getränke zu meiden und ab 22 Uhr keine Mahlzeit mehr einzunehmen. Die Studienteilnehmer erschienen somit nüchtern am Morgen, um 7:30 Uhr in der Ghrelinstudie und um 8 Uhr in der Leptinstudie, zur jeweiligen Versuchs-sitzung im neurophysiologischen Labor der Medizinischen Klinik I der Universität zu Lübeck.

Im Vorfeld wurden die Probanden über den Ablauf und die Risiken der einzelnen Untersuchungsmethoden aufgeklärt. Jeder Studienteilnehmer gab seine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie ab. Vor Versuchsbeginn wurden die Probanden zur Toilette gebeten. Dadurch sollte der aktivierende Einfluss einer gefüllten Harnblase auf das sympathische Nervensystem reduziert werden [43]. Es folgte die Bestimmung des Körpergewichts, um die Dosis der gewichtsadaptierten Substanzen (insbes. Leptin, Ghrelin) zu ermitteln sowie eine kurze Anamneseerhebung zum allgemeinen Befinden. Nachdem sich der Proband auf dem Bett in eine möglichst bequeme Position gelegt hatte, wurde ihm an beiden Armen je eine periphere Venenverweilkanüle gelegt. In bestimmten Zeitabständen (siehe dazu Abbildungen 2.2 und 2.3) erfolgten über diese Zugänge sowohl die Substanzgabe als auch die Blutentnahmen. Die erste Blutentnahme wurde erst nach einer 20-minütigen Ruhephase durchgeführt, da Stressreize (z.B. Schmerz beim Nadeleinstich) und orthostatische Veränderungen einen Konzentrationsanstieg einiger Laborparameter, insbesondere der Katecholamine, bewirken [56]. Zur Erfassung von kardiovaskulären Parametern, die für einen weiteren Studienpart der Gesamtstudie relevant waren [88,94], erfolgte die Anlage von 3-Kanal-EKG- und Blutdruckmessgeräten. Jedem Probanden wurde außerdem ein Atemgürtel (Pneumotrace®II) um den Brustkorb gebunden, damit die Frequenz der Atemzyklen aufgezeichnet werden konnte. Abschließend wurde eine Mikroneurographie installiert, welche der Bestimmung der sympathischen Nervenaktivität zum Muskelgefäßbett (*muscle sympathetic nerve activity* (MSNA)) diene. Danach konnte mit der Aufzeichnung sämtlicher Parameter begonnen werden.

Sowohl während der Untersuchungen als auch im Anschluss war bei Fragen oder Beschwerden jederzeit ein Arzt telefonisch erreichbar. In der Zeit der Versuchssitzung war durchgehend mindestens ein Doktorand anwesend.

2.4 Versuchsprotokolle

2.4.1 Leptinversuch

Eine genaue Übersicht zum zeitlichen Versuchsaufbau wird aus der Abbildung 2.2 ersichtlich. Ausgehend von der Applikation von Leptin bzw. Placebo gliederte sich der Versuch in die Phasen vor und nach Substanzgabe. Alle anderen unabhängigen Variablen wurden wiederholt in beiden Phasen erhoben. Nach ca. sechs Stunden endete die jeweilige Versuchssitzung.

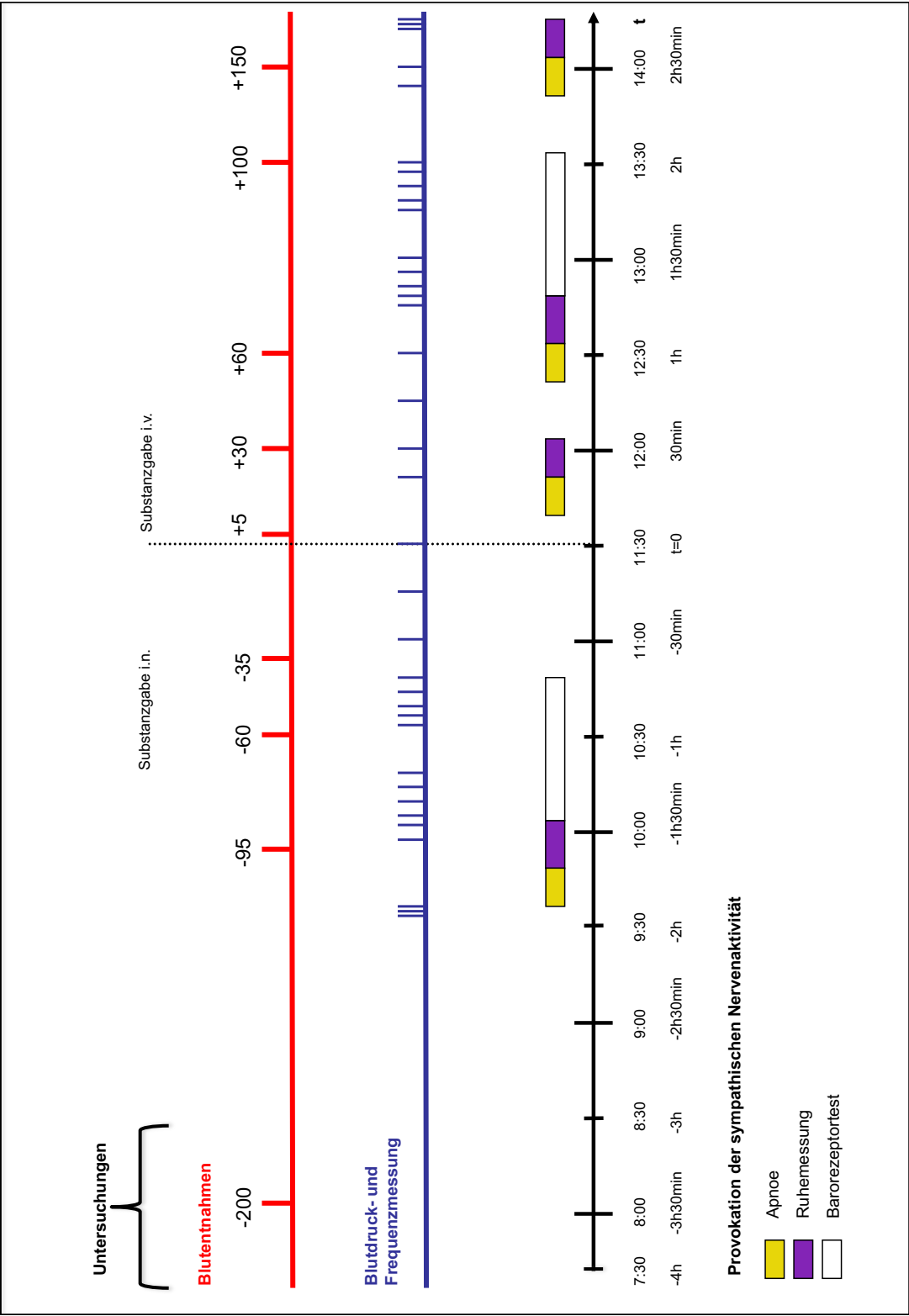


Abb. 2.2: Protokoll der Leptinstudie. Auf den farbigen Zeitstrahlen sind die Zeitpunkte der verschiedenen Untersuchungselemente aufgetragen: Blutentnahmen (rot), hämodynamische Messungen (blau). Die farbigen Querbalken geben den Ablauf und die Zeiträume des Barorezeptortests wider.

2.4.2 Ghrelinversuch

Die Abbildung 2.3 zeigt eine Übersicht über den Ablauf einer Versuchssitzung. Der Versuch gliederte sich in die Phasen vor und nach der Substanzapplikation (Placebo bzw. Ghrelin). In beiden Phasen wurde jede Untersuchung mindestens einmal wiederholt durchgeführt. Der Versuch war nach ca. fünf Stunden beendet. Die Unterschiede des zeitlichen Ablaufs zur Leptinstudie beruhen u.a. auf der unterschiedlichen Kinetik der Plasmaspiegel. Nach i.v.-Bolus kommt es zu einer schnelleren metabolischen Inaktivierung von Ghrelin verglichen mit Leptin.

2.5 Spezielle Untersuchungen

In den folgenden Abschnitten wird auf die in den Abbildungen 2.2 und 2.3 ersichtlichen Methoden eingegangen. Dabei werden vor allem diejenigen Untersuchungen detailliert erläutert, deren Ergebnisse für die Fragestellung der hier vorliegenden Dissertation von hoher Relevanz sind. Am Ende des Unterkapitels erfolgt eine kurze Beschreibung der Methoden, die zwar Bestandteil der Gesamtstudie sind, aber als eigenes Teilprojekt im Rahmen einer anderen wissenschaftlichen Arbeit abgehandelt werden (Mikroneurographie, Kreislaufparameter) [93, 94].

Alle nachfolgend genannten Zeitangaben beziehen sich auf den Zeitpunkt der intravenösen Substanzgabe ($t=0$ min).

2.5.1 Laboruntersuchungen

2.5.1.1 Leptinversuch

Die peripher-venösen Zugänge (20G Vasofix® Braunüle) wurden in Abhängigkeit von den anatomischen Venenverhältnissen entweder antekubital oder am Handrücken gelegt. Vor jeder Blutentnahme wurden 2 ml Blut in eine Spritze aspiriert und verworfen, um einen Verdünnungseffekt der Proben zu vermeiden.

Im Verlaufe jeder Sitzung wurden insgesamt neun venöse Blutentnahmen durchgeführt, um intermittierend die Konzentration der Substanzen Adrenalin, Noradrenalin, Leptin, Cortisol, Insulin, ACTH, Renin, Laktat, Glukagon und Glukose zu ermitteln. Die Vollblutmenge pro Abnahme betrug 23,2 ml. Daraus ergab sich für den Probanden ein Gesamtblutverlust von ca. 210 ml pro Versuchstag.

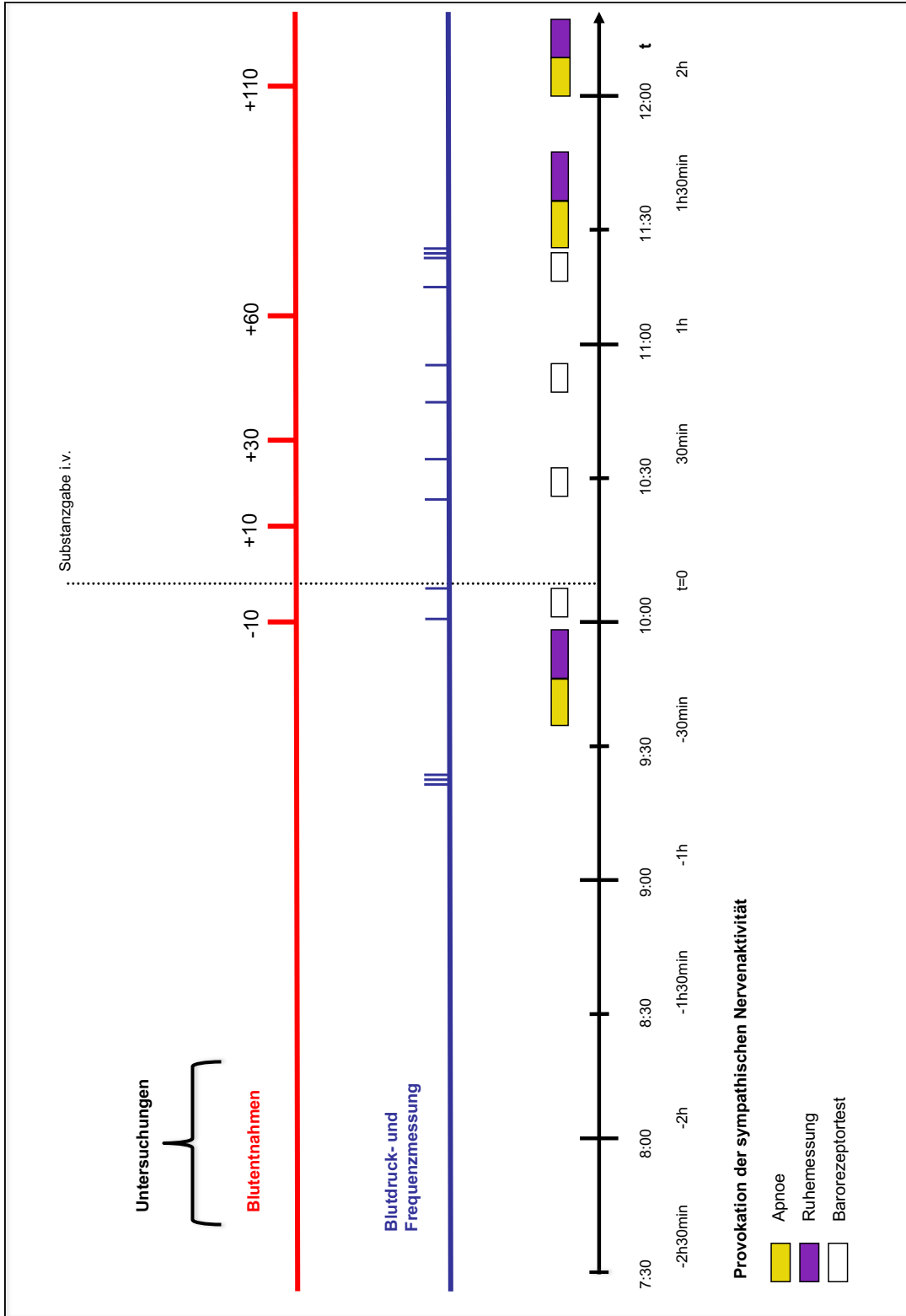


Abb. 2.3: Protokoll der Ghrelinstudie. Auf den farbigen Zeitstrahlen sind die Zeitpunkte der verschiedenen Untersuchungselemente aufgetragen: Blutentnahmen (rot), hämodynamische Messungen (blau). Die farbigen Querbalken geben den Ablauf und die Zeiträume der Baroreflexuntersuchung wieder.

Die Blutentnahmen fanden gemäß Abbildung 2.2 zu folgenden Zeitpunkten statt: $t=-200$ min, $t=-95$ min, $t=-60$ min, $t=-35$ min, $t=+5$ min, $t=+30$ min, $t=+60$ min, $t=+100$ min, $t=+150$ min. Zur Bestimmung von Leptin, Insulin, freie Fettsäuren und Kortisol wurden 9 ml Serum-Monovetten® benutzt und zur Analyse von Laktat und Glukose 2,8 ml Fluoridröhrchen. Die Blutentnahmen für die Messung von ACTH und Renin erfolgten mit Hilfe von 4,9 ml EDTA-Monovetten® (enthalten 1,2 - 2 mg EDTA/ml Blut). Zur Bestimmung der Katecholamine wurden Recipe®-Monovetten verwendet. Alle Monovetten wurden im Anschluss für circa zwanzig Minuten in einem Kühlschrank gekühlt und aufrecht gelagert, damit der Ablauf notwendiger Gerinnungsprozesse gewährleistet werden konnte. In einem nächsten Schritt erfolgte die Zentrifugation in einer vorgekühlten Zentrifuge (Sigma® Kühlzentrifuge) bei 4° C mit 4000 U/min für zehn Minuten. Lediglich für das Fluoridröhrchen bedurfte es weder einer Kühlung noch eines Trennverfahrens.

Danach wurden die jeweils notwendigen Überstände in Safe-lock-Gefäße (Fa. Eppendorf) abpipettiert. Unmittelbar danach folgte die Kühlung der Eppendorfgefäße in einer -80 °C Umgebung, in der die Blutproben bis zur Analyse verblieben.

2.5.1.2 Ghrelinversuch

Die Laboranalytik im Ghrelinversuch unterschied sich im Wesentlichen lediglich durch die Anzahl der Blutproben und der Zeitpunkte der Blutentnahmen. Insgesamt wurden fünf Blutproben zu den Zeitpunkten $t= -10$ min, $t= +10$ min, $t= +30$ min, $t +60$ min und am Ende des Experimentes ($t +110$ min) entnommen.

2.5.1.3 Analyse der Blutproben

Die Routinelaborparameter der im Rahmen der Voruntersuchung gewonnenen Blutproben wurden am Institut für Klinische Chemie der Universität zu Lübeck bestimmt.

Die Quantifizierung von ACTH, Cortisol, Insulin, Katecholamine, Leptin, Ghrelin und Renin erfolgte im Forschungslabor der Medizinischen Klinik I der Universität zu Lübeck mit Hilfe käuflicher Assays (siehe Anhang 7.2) .

2.5.2 Weitere Messverfahren im Rahmen weiterer Studienteile

Neben der Bestimmung der metabolischen Parameter dieser Teilstudie wurden im Rahmen der Gesamtstudie zusätzlich die Aktivität des sympathischen Nervensystems und

kardiovaskuläre Parameter untersucht. Hierfür kamen folgende Messverfahren zum Tragen: Mikroneurographie der MSNA, inklusive Baroreflextest und Herzfrequenz- sowie Blutdruckmessungen.

Die Mikroneurographie ist ein sensibles Verfahren zur direkten Ableitung der Aktivität des vasokonstriktorischen Sympathikus am Muskelgefäßbett (MSNA). Zur Bestimmung der Sensitivität des Baroreflexes wurde vor und nach Substanzgabe ein Baroreflextest (BRT) durchgeführt [39]. Dabei wurde der Blutdruck zunächst durch einen direkten Vasodilatator (Nitroprussid) gesenkt und im weiteren Verlauf durch eine vasokonstriktorisch wirkende Substanz (Phenylephrin) angehoben. Während des BRT fanden engmaschig oszillometrische und volumen-photoplethysmographische Blutdruck- sowie Pulsmessungen statt.

Es ist nicht auszuschließen, dass sich beide Teilstudien, d.h. Kreislauf- und Baroreflexuntersuchungen einerseits und die hier dargelegten Untersuchungen des Fett- und Kohlenhydratmetabolismus andererseits gegenseitig beeinflussen können. So könnten die im Zuge der sympathischen Provokationsmanöver ausgeschütteten Stresshormone einen Einfluss auf die hier gemessenen metabolischen Parameter ausüben. Durch ein inhaltlich und zeitlich klar strukturiertes Studiendesign, bei dem jeder Proband unter standardisiertem Ablauf seine eigene Placebo-Kontrolle darstellt (within-subject-Vergleich), soll eine systematische Verzerrung der Ergebnisse minimiert werden. Die Versuchsprotokolle der Placebo- und der Verumgruppe sind identisch. Eine relevante Beeinflussung der Ergebnisse ist somit unwahrscheinlich.

2.6 Statistik

Nach Abschluss der Versuchsreihe und Zusammentragen der erhobenen Daten folgte in einem nächsten Schritt die statistische Analyse mittels „Analysis of Variance“ (ANOVA) für allgemeine lineare Modelle mit dem Messwiederholungsfaktor „Zeit“ und dem Gruppen-Faktor „Behandlung“. Die Analyse erfolgte zwischen den Versuchstagen und -bedingungen aufgrund des Crossoverdesigns intraindividuell, wobei die Werte des Placeboversuchs mit denen aus dem Versuch der Leptin- bzw. Ghrelingabe verglichen wurden. Zum anderen konnte ein intraindividueller Vergleich der Daten vor Substanzgabe und den Zeitpunkten danach innerhalb einer jeweiligen Versuchssitzung gezogen werden. Darüber hinaus wurde für alle signifikanten Ergebnisse eine Post-hoc-Analyse nach Sidak durchgeführt. Als statistisch signifikant galt ein p-Wert $< 0,05$. Für Paarvergleiche wurde ein Student T-Test herangezogen. Die statistische Signifikanz wurde hierbei ebenfalls mit einem p-Wert $< 0,05$ definiert.

Die Wahrscheinlichkeitsbestimmung der Insulinresistenz erfolgt über ein mathematisches Modell, dem Homeostasis Model Assessment (HOMA)-Index [97]. Der Berechnung liegen die Nüchternwerte von Glukose und Insulin im Blut zu Grunde. Die Einteilung erfolgt in insgesamt 4 Stadien, von Stadium 1 („Eine Insulinresistenz ist unwahrscheinlich“), entsprechend einem *Index – Wert* < 2 , bis Stadium 4 („Eine Insulinresistenz ist vorhanden“), entsprechend einem *Index – Wert* > 5 .

Nachfolgend werden sämtliche Daten als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

3 Ergebnisse

Für die Auswertung der Laboruntersuchungen konnten in beiden Studien zwölf Probanden für jede Bedingung einbezogen werden. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt sowohl graphisch als auch tabellarisch. Die Werte der Stoffwechselfparameter sind in den Graphen auf den Ausgangszeitpunkt, d.h. Level vor jeweiliger Substanz- bzw. Placebogabe normalisiert und die relative Änderung wird angegeben, sodass Unterschiede zwischen den einzelnen Bedingungen vor Substanzgabe nivelliert und statistisch neutralisiert werden. Die Absolutwerte werden dennoch in den entsprechenden Kapiteln tabellarisch aufgelistet (3.2 3.3). Ein Teil der Konzentration des Stoffwechselfparameters Insulin lag unterhalb der Nachweisgrenze. Daher wurde hier auf eine Normalisierung verzichtet. Stattdessen sind graphisch die absoluten Werte abgebildet.

Die Studie folgte einem cross-over-Design. Somit stellte jeder Proband seine eigene Kontrollperson dar. Die Normalisierung bezogen auf die Ausgangslevel und die within-subject-Auswertung ermöglichen ein maximales Maß an Vergleichbarkeit und erhöhen die statistische Power. Durch den zeitlichen Abstand von ca. vier Wochen zwischen den Versuchen sollte ein prolongierter Sequenzeffekt nach Leptin- oder Ghrelinapplikation möglichst ausgeschlossen werden.

3.1 Anthropometrische Daten

Tab. 3.1: Anthropometrische Daten aus der Leptinstudie bzw. der Ghrelinstudie. Die angegebenen Daten sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Parameter (Einheit)	Leptinstudie (n=12)	Ghrelinstudie (n=12)
Alter (Jahre)	24,2 \pm 2,1	23,3 \pm 3,5
Größe (cm)	1,8 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1
Gewicht (kg)	80,2 \pm 7,0	78,1 \pm 9,8
BMI (kg/m ²)	23,7 \pm 0,6	23,6 \pm 2,1

3.2 Leptin

3.2.1 Serum-Leptinwerte

Vor Substanzgabe (Placebo, Leptin i.v., Leptin i.n.) waren in allen drei Bedingungen keine signifikanten Unterschiede der absoluten Leptinwerte im Serum zu beobachten. Die Ausgangswerte betragen $4,0 \text{ ng/ml} \pm 0,7 \text{ SEM}$ für Placebo, $3,5 \text{ ng/ml} \pm 0,6 \text{ SEM}$ für Leptin i.v. und $3,5 \text{ ng/ml} \pm 0,6 \text{ SEM}$ für Leptin i.n. (siehe 3.1). Bei intravenöser Leptinapplikation kam es nach fünf Minuten zu einem maximalen Anstieg der Leptin-Serumkonzentration mit einem durchschnittlichen Wert von 708 ng/ml . Dies entspricht einer Erhöhung um das 200-fache bezogen auf den Ausgangswert. Im weiteren Verlauf kam es zunächst zu einem steilen, danach progredient flacheren Abfall des Leptinspiegels. Die Werte blieben bis zum vorletzten Messzeitpunkt signifikant erhöht im Vergleich zur Placebobedingung. Im ungepaarten T-Test zeigte sich auch nach intranasaler Leptingabe zum ersten Zeitpunkt eine signifikante Erhöhung der Leptin-Serumspiegel im Vergleich zur Placebobedingung. Dieser Anstieg fiel deutlich geringer aus als nach i.v.-Leptingabe. Nach Placebogabe waren keine Veränderungen des Leptinspiegels zu verzeichnen.

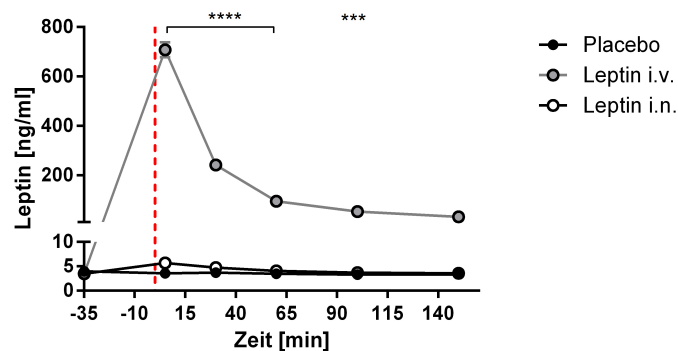


Abb. 3.1: Leptinwerte während des Versuchs in ng/ml . Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe ($t=0$). **** $\hat{=}$ $p \leq 0,0001$ bzw. *** $\hat{=}$ $p \leq 0,001$ für Vergleich zwischen intravenöser Substanzgabe und Placebo.

3.2.2 Ausgangswerte der Stoffwechselfparameter

Nachfolgend sind alle Ausgangswerte zum Zeitpunkt -35min der gemessenen Parameter von Leptin i.v. und i.n. tabellarisch aufgeführt. Die basalen Werte wurden jeweils mittels ungepaarten T-Tests mit den entsprechenden Placebowerten auf signifikante Unterschiede getestet. Alle gemessenen p-Werte waren > 0.05 und daher nicht signifikant unterschiedlich.

Tab. 3.2: Basale Werte Leptinstudie. Angabe der Parameter als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler. Nicht signifikant (ns).

Parameter	Placebo		Leptin i.v.		Leptin i.n.		p
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
FFA [mmol/l]	0,43 \pm	0,05	0,47 \pm	0,08	0,51 \pm	0,06	ns
Triglyceride [mmol/l]	0,94 \pm	0,15	0,8 \pm	0,04	0,84 \pm	0,07	ns
Glycerin [mmol/l]	0,16 \pm	0,02	0,17 \pm	0,01	0,16 \pm	0,01	ns
Glukose [mmol/l]	5,1 \pm	0,07	4,9 \pm	0,11	5,3 \pm	0,18	ns
Laktat [mmol/l]	0,84 \pm	0,06	0,93 \pm	0,07	0,91 \pm	0,08	ns

3.2.3 Auswertungen im Versuchsablauf

Die statistische Auswertung der Metabolite und der Hormone erfolgte mittels einer Two-Way ANOVA. Der Einfluss der Faktoren Substanzgabe, Zeit und Interaktion auf die Messdaten ist in den nachfolgenden Tabellen dargelegt (siehe 3.3 und 3.4). Mittels Post-hoc-Analyse wurde auf potenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen zu spezifischen Zeitpunkten getestet. Eine detaillierte Beschreibung der Unterschiede folgt in den entsprechenden Unterkapiteln. Die Two-way-ANOVA zeigte einen signifikanten Einfluss der Faktoren Substanzgabe und Zeit auf Glukose, wobei der Einfluss nach intravenöser Applikation eine höhere Signifikanz aufweist als nach intranasaler Gabe. Darüber hinaus konnte ein hochsignifikanter Einfluss auf Laktat festgestellt werden, allerdings lediglich nach intravenöser Applikation. Alle anderen Werte waren nicht signifikant.

Tab. 3.3: Two-way-ANOVA der Metabolite und Hormone. Einfluss der Faktoren Substanzgabe und Zeit auf die Messdaten. **** $\hat{=}$ $p \leq 0,0001$; ** $\hat{=}$ $p \leq 0,01$; * $\hat{=}$ $p \leq 0,05$; nicht signifikant (ns)

	intravenös vs. Placebo		intranasal vs. Placebo	
	PSubstanzgabe	PZeit	PSubstanzgabe	PZeit
FFA	0,3261 (ns)	0,0501 (ns)	0,5834 (ns)	0,1194 (ns)
Triglyceride	0,8081 (ns)	0,4101 (ns)	0,1950 (ns)	0,2497 (ns)
Glycerin	0,4428 (ns)	0,5873 (ns)	0,6336 (ns)	0,6449 (ns)
Glukose	< 0,0001(****)	0,0016 (**)	0,0145 (*)	< 0,0001(****)
Laktat	< 0,0001(****)	0,1840 (ns)	0,0939 (ns)	0,5858 (ns)
Insulin	0,0745 (ns)	0,4832 (ns)	0,4073 (ns)	0,7127 (ns)
ACTH	0,0841 (ns)	0,9075 (ns)	0,6131 (ns)	0,8771 (ns)
Kortisol	< 0,0001 (****)	0,0800 (ns)	0,0027(**)	0,0453 (*)
Noradrenalin	0,0999	0,0743 (ns)	0,0491 (*)	0,0721 (ns)
Adrenalin	0,0618 (ns)	0,0022 (**)	0,1044 (ns)	< 0,0001(****)

Tab. 3.4: Two-way-ANOVA der Metabolite und Hormone. Einfluss des Faktors Interaktion auf die Messdaten. Nicht signifikant (ns)

	intravenös vs. Placebo	intranasal vs. Placebo
	PInteraktion	PInteraktion
FFA	0,7265 (ns)	0,8651 (ns)
Triglyceride	0,9750 (ns)	0,9952 (ns)
Glycerin	0,7554 (ns)	0,7277 (ns)
Glukose	0,3663 (ns)	0,8923 (ns)
Laktat	0,4757 (ns)	0,8343 (ns)
Insulin	0,9687 (ns)	0,9369 (ns)
ACTH	0,9847 (ns)	0,9904 (ns)
Kortisol	0,6605 (ns)	0,4666 (ns)
Noradrenalin	0,9716 (ns)	0,9737 (ns)
Adrenalin	0,9909 (ns)	0,7953 (ns)

3.2.4 Auswirkungen der intravenösen und intranasalen Gabe von Leptin auf den Fettstoffwechsel

Es wurden die Auswirkungen der intravenösen und intranasalen Leptingabe auf die drei Fettstoffwechselmetabolite FFA, Triglyceride und Glycerine im Vergleich zur Placebobedingung untersucht.

Vor und nach intravenöser und intranasaler Leptingabe waren im Vergleich zur Placebokontrolle keine signifikanten Unterschiede an den Metaboliten des Fettstoffwechsels zu verzeichnen. In allen drei Bedingungen kam es im Verlauf des Experiments zu einem geringen Anstieg der freien Fettsäuren. Die Triglyceride und die freien Glycerine blieben auf einem Plateau.

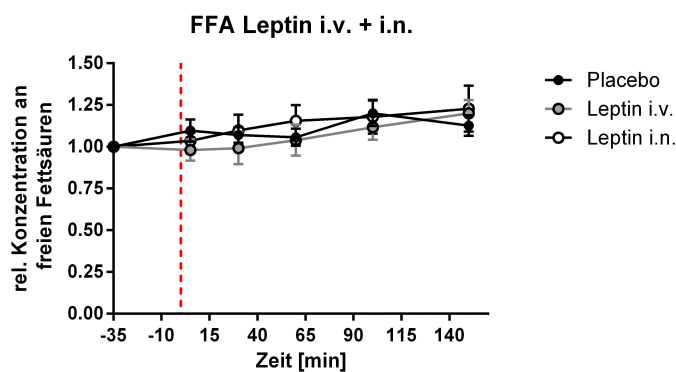


Abb. 3.2: Quantitative Entwicklung von FFA nach intravenöser und intranasaler Leptingabe. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. Normalisierung der Werte auf -35 min vor Substanzgabe. Relative Mengen an FFA im Blut über einen Zeitraum von 150 min nach Substanzgabe. 2-way-ANOVA mit Sidak-Post-Hoc-Test zeigt keine signifikanten Unterschiede.

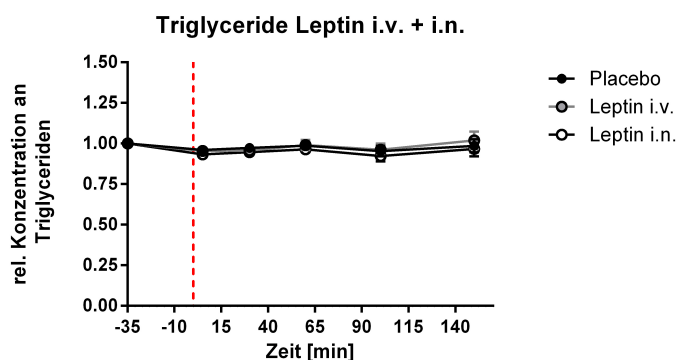


Abb. 3.3: Quantitative Entwicklung von Triglyceriden nach intravenöser und intranasaler Leptingabe. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. Normalisierung der Werte auf -35 min vor Substanzgabe. Relative Mengen an Triglyceriden im Blut über einen Zeitraum von 150 min nach Substanzgabe. 2-way-ANOVA mit Sidak-Post-Hoc-Test zeigt keine signifikanten Unterschiede.

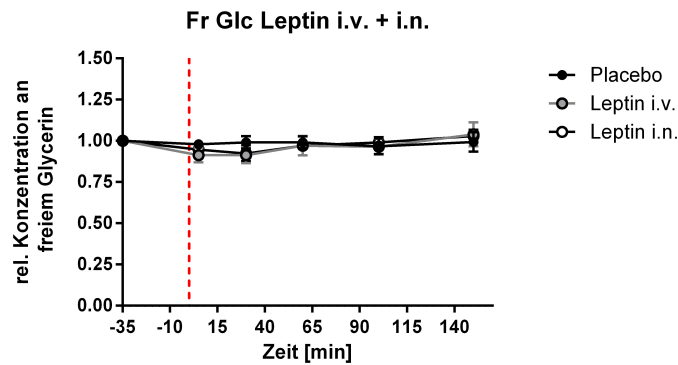


Abb. 3.4: Quantitative Entwicklung des Glycerinspiegels nach intravenöser und intranasaler Leptingabe. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. Normalisierung der Werte auf -35 min vor Substanzgabe. Relative Mengen an Glycerin im Blut über einen Zeitraum von 150 min nach Substanzgabe. 2-way-ANOVA mit Sidak-Post-Hoc-Test zeigt keine signifikanten Unterschiede.

3.2.5 Auswirkungen der intravenösen und intranasalen Gabe von Leptin auf den Glukosestoffwechsel

Nachfolgend werden die Effekte der intravenösen und intranasalen Leptingabe auf den Glukosemetabolismus dargelegt. Als Stoffwechselfparameter wurden Glukose, Laktat und Insulin herangezogen.

Während der Glukosespiegel nach Placebogabe zu den Zeitpunkten +30, +60, +100 und +150 im Vergleich zum Ausgangswert signifikant abfiel, konnten nach intravenöser Gabe keine signifikanten Änderungen verzeichnet werden. Nach intranasaler Leptinapplikation war eine signifikante Reduktion der Glukosekonzentration im Vergleich zum Ausgangswert ausschließlich zum Zeitpunkt +150 min zu beobachten. Die Glukosekonzentration war nach intravenöser Leptingabe im Vergleich zur Placebobedingung in den Zeitpunkten +30 min, +60 min und +100 min signifikant erhöht.

Zum Messzeitpunkt unmittelbar nach intravenöser Leptinapplikation zeigte sich ein mäßiger Abfall des Laktatspiegels zum Ausgangswert (ANOVA: Messfaktor $p_{\text{Substanzgabe}} < 0,05$), unter Placebobedingung hingegen blieb der Laktatspiegel weitgehend konstant. In der Post-Hoc-Analyse zeigte sich, dass der Laktatspiegel lediglich zum fünften Messzeitpunkt (nach 100 min) nach intravenös appliziertem Leptin signifikant erniedrigt war.

Zu keinem Zeitpunkt konnte ein signifikanter Unterschied auf den Insulinspiegel festgestellt werden.

Nach intranasaler Leptingabe zeigten sich bei keinem der Metaboliten eine signifikante Änderung.

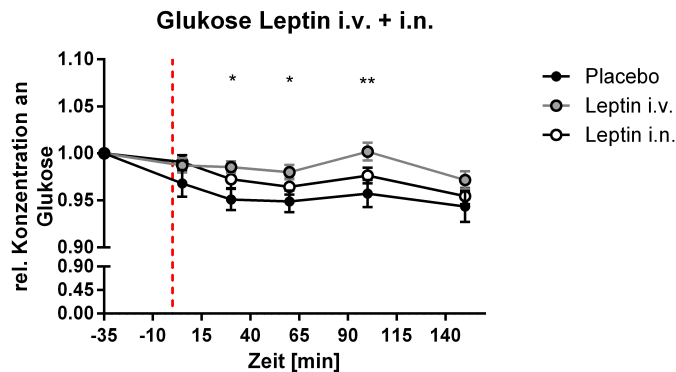


Abb. 3.5: Quantitative Entwicklung des Glukosespiegels nach intravenöser und intranasaler Leptingabe. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. Normalisierung der Werte auf -35 min vor Substanzgabe. Relative Mengen an Glukose im Blut über einen Zeitraum von 150 min nach Substanzgabe. Angezeigte Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich Leptin i.v. versus Placebogabe. 2-way-ANOVA mit Sidak-Post-Hoc-Test. * $\hat{=}$ $p_{\text{Substanzgabe}} < 0,05$, ** $\hat{=}$ $p_{\text{Substanzgabe}} < 0,01$

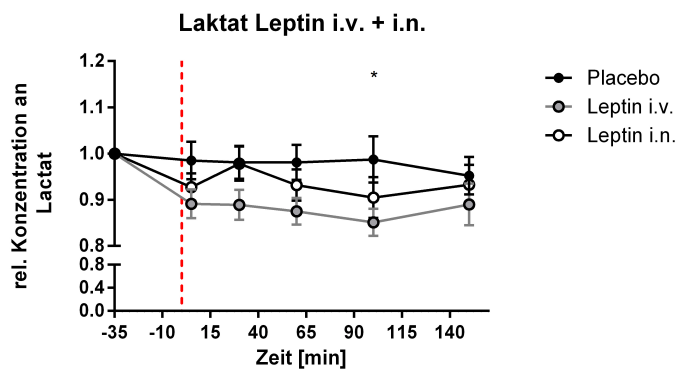


Abb. 3.6: Quantitative Entwicklung des Laktatspiegels nach intravenöser und intranasaler Leptingabe. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. Normalisierung der Werte auf -35 min vor Substanzgabe. Relative Mengen an Laktat im Blut über einen Zeitraum von 150 min nach Substanzgabe. Angezeigte Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich Leptin i.v. versus Placebogabe. 2-way-ANOVA mit Sidak-Post-Hoc-Test. * $\hat{=}$ $p_{\text{Substanzgabe}} < 0,05$

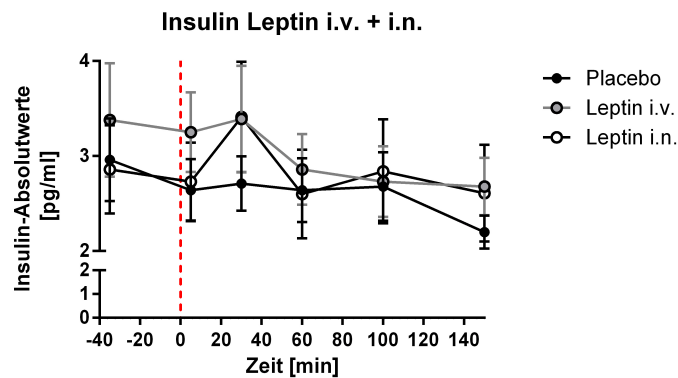


Abb. 3.7: Quantitative Entwicklung der Insulinwerte nach intravenöser und intranasaler Leptingabe. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. Normalisierung der Werte auf -35 min vor Substanzgabe. Absolute Mengen an Insulin im Blut über einen Zeitraum von 150 min nach Substanzgabe. Angezeigte Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich Leptin i.v. versus Placebogabe. 2-way-ANOVA mit Sidak-Post-Hoc-Test zeigt keine signifikanten Unterschiede.

3.2.6 ACTH, Kortisol und Katecholamine

Nachfolgend werden die Effekte der intravenösen und intranasalen Leptinapplikation auf die Hormone ACTH, Kortisol, Noradrenalin und Adrenalin aufgeführt.

Die Konzentration des ACTH fiel in allen drei Bedingungen zunächst ab, mutmaßlich infolge der normalen zirkadianen Rhythmik. Nach Leptingabe konnte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung im Vergleich zur Placebogabe verzeichnet werden (3.8).

Die Kortisolwerte stiegen nach intravenöser Leptinapplikation zum Zeitpunkt +30 min im Vergleich zu Placebogabe signifikant an. Die Konzentration erreichte hierbei ein Maximum mit einem Anstieg von 36% zur Ausgangskonzentration. Im weiteren Verlauf nach i.v. Gabe sowie zu allen Zeitpunkten nach i.n. Gabe konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (siehe 3.9).

Während und nach dem BRT, der ca. 90 min nach intravenöser bzw. 120 min nach intranasaler Substanzgabe durchgeführt wurde (siehe 2.2), kam es erwartungsgemäß zu einem Anstieg der Katecholaminkonzentrationen. Der Anstieg liegt in der durch das sympathische Nervensystem vermittelten Gegenregulation nach Blutdruckabfall begründet, welcher durch das in der Gesamtstudie verwendete Nitroprussid verursacht wird [94]. Es zeigten sich bei beiden Katecholaminen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Placebobedingung (siehe 3.10 und 3.11).

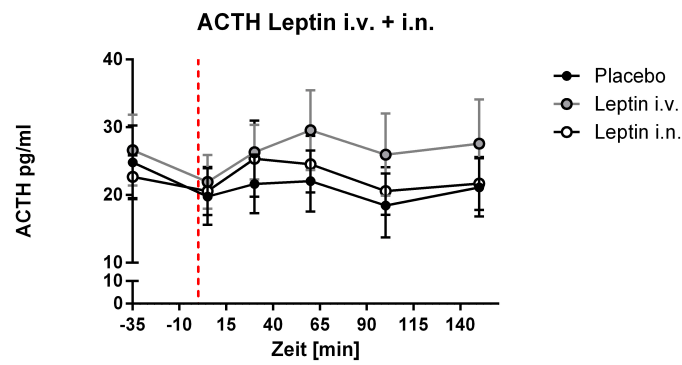


Abb. 3.8: ACTH-Werte nach intravenöser und intranasaler Leptingabe. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe.

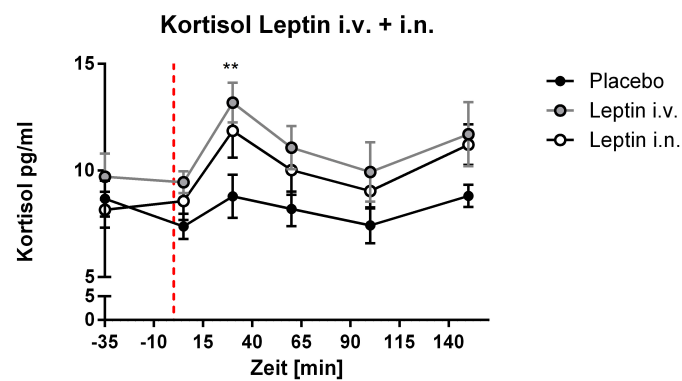


Abb. 3.9: Kortisolwerte während des Versuchs. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. * $\hat{=}$ $p < 0,05$ (t-Test) für Vergleich zwischen Leptin und Placebo nach intravenöser Applikation.

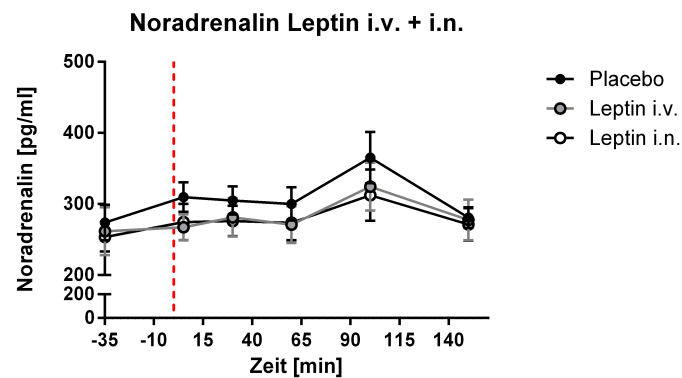


Abb. 3.10: Noradrenalinwerte nach intravenöser und intranasaler Leptingabe. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe.

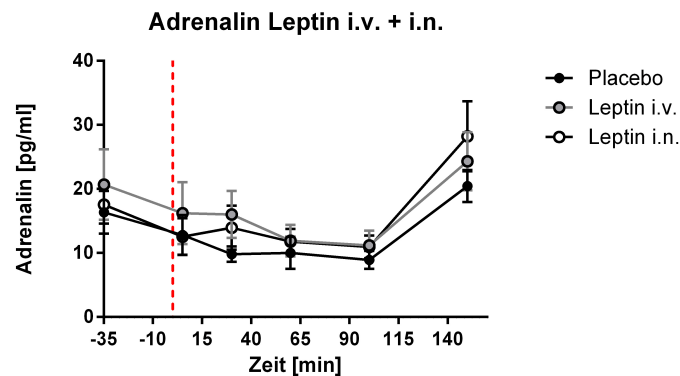


Abb. 3.11: Adrenalinwerte während des Experiments. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe.

3.3 Ghrelin

3.3.1 Serum-Ghrelinwerte

Vor Gabe von Ghrelin oder Placebo gab es im Vergleich beider Bedingungen keine signifikanten Unterschiede der Ghrelinwerte im Serum. Die Werte zum Zeitpunkt -10 min betragen $819,4 \text{ pg/ml} \pm 61,8 \text{ SEM}$ für Ghrelin i.v. und $739,8 \text{ pg/ml} \pm 48,2 \text{ SEM}$ für Placebo. In der Verumbedingung kam es zehn Minuten nach i.v. Applikation mit einer Steigerung um das 18fache zu einem maximalen Anstieg der Ghrelinkonzentration (13450 pg/ml). Die Spiegel fielen im weiteren Verlauf exponentiell ab. Bis zum vorletzten Messzeitpunkt blieben die Werte im Vergleich zur Placebobedingung signifikant erhöht. In der Placebobedingung waren keine Änderungen des Ghrelinspiegels zu verzeichnen.

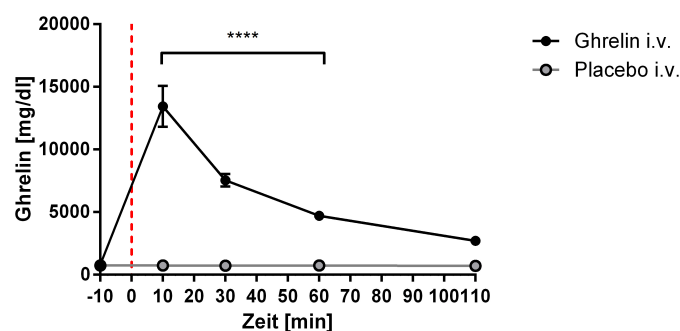


Abb. 3.12: Ghrelinwerte während des Versuchs in mg/dl. Die vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. **** $\hat{=}$ $p_{\text{Substanzgabe}} < 0,0001$ für Vergleich zwischen Ghrelin und Placebo.

3.3.2 Ausgangswerte der Stoffwechselfparameter

Nachfolgend sind alle Ausgangswerte zum Zeitpunkt -10 min der gemessenen Parameter von Ghrelin i.v. tabellarisch aufgeführt. Die basalen Werte wurden jeweils mittels ungepaarten T-Tests mit den entsprechenden Placebowerten auf signifikante Unterschiede getestet.

Tab. 3.5: Basale Werte Ghrelinstudie. Angabe der Parameter als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler. $p \hat{=}$ p-Wert der Parameter des Verumversuchs im Vergleich zur Placebo-kontrolle. Messzeitpunkt -10 min vor Substanzgabe. (ns = nicht signifikant)

Parameter	Placebo		Ghrelin i.v.		p-Wert
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	
FFA [mmol/l]	0,37	\pm 0,02	0,49	\pm 0,13	ns
Triglyceride [mmol/l]	0,88	\pm 0,18	0,73	\pm 0,07	ns
Glycerin [mmol/l]	0,2	\pm 0,02	0,15	\pm 0,02	ns
Glukose [mmol/l]	5,14	\pm 0,10	5,01	\pm 0,08	ns
Laktat [mmol/l]	1,04	\pm 0,16	0,71	\pm 0,07	ns

3.3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse mittels Two-way-ANOVA ergab einen signifikanten Einfluss des Faktors Substanzgabe auf nahezu alle Metaboliten und Hormone mit Ausnahme des Insulins. Der Faktor Zeit war bei FFA, Glukose, ACTH, GH und Kortisol signifikant (siehe 3.6).

Tab. 3.6: Two-way-ANOVA der Metabolite und Hormone Einfluss der Faktoren Substanzgabe, Zeit und Interaktion auf die Messdaten. **** $\hat{=}$ $p \leq 0,0001$; *** $\hat{=}$ $p \leq 0,001$; ** $\hat{=}$ $p \leq 0,01$; * $\hat{=}$ $p \leq 0,05$; nicht signifikant (ns)

intravenös vs. Placebo			
	PSubstanzgabe	PZeit	PInteraktion
FFA	0,0001 (***)	0,0014 (**)	0,2055 (ns)
Triglyceride	0,0058 (**)	0,9959 (ns)	0,6472 (ns)
Glycerin	0,0005 (***)	0,3404 (ns)	0,2465 (ns)
Glukose	< 0,0001(****)	< 0,0001 (****)	0,8263 (ns)
Laktat	0,0063(**)	0,8656 (ns)	0,2092 (ns)
Insulin	0,9628 (ns)	0,7856 (ns)	0,9641 (ns)
ACTH	< 0,0001 (****)	< 0,0001 (****)	< 0,0001 (****)
GH	< 0,0001 (****)	< 0,0001 (****)	< 0,0001 (****)
Kortisol	< 0,0001 (****)	0,0004 (***)	< 0,0001 (****)
Noradrenalin	0,3730 (ns)	0,9295 (ns)	0,9997 (ns)
Adrenalin	< 0,0001 (****)	0,0003 (***)	0,0004 (***)

3.3.4 Auswirkungen der intravenösen Gabe von Ghrelin auf den Fettstoffwechsel

Untersucht wurden die Effekte der intravenösen Ghrelingabe auf die drei Fettstoffwechselmetabolite FFA, Triglyceride und Glycerine im Vergleich zur Placebobedingung.

Nach Ghrelingabe kam es zu einem steilen Anstieg der FFA, nach Placebogabe zu einem geringen Anstieg, jeweils bis zum dritten Messzeitpunkt (+30 min), an dem ein signifikanter Unterschied zwischen Verum und Placebo erreicht wurde. Im weiteren Verlauf blieb der FFA-Spiegel erhöht gegenüber der Placebokontrolle, allerdings ohne statistische Signifikanz.

Die Triglyceridspiegel unterschieden sich in beiden Bedingungen nicht signifikant. Allerdings zeigte sich zum Messpunkt +5 min ein diskreter Anstieg der Triglyceride nach Verumgabe und ein diskreter Abfall nach Placebogabe. Im weiteren Verlauf stellte sich jeweils ein Plateau ein.

Es zeigte sich ein geringer Anstieg der Glycerinwerte nach Verumgabe. Unter Placebobedingung blieben die Werte weitgehend konstant. Zum letzten Zeitpunkt (+110 min) erreichte der Anstieg im Ghrelinversuch gegenüber Placebo statistische Signifikanz.

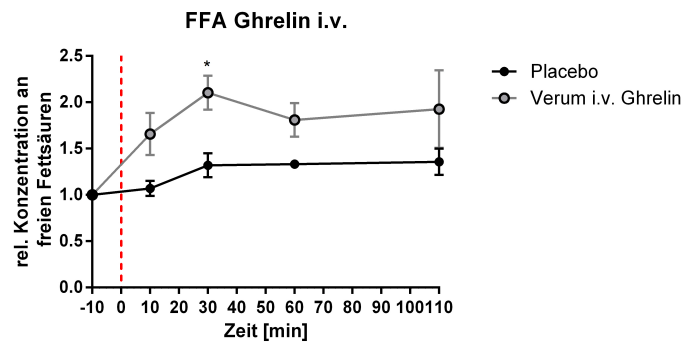


Abb. 3.13: Quantitative Entwicklung von FFA nach intravenöser Ghrelingabe. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. Normalisierung der Werte auf -10 min vor Substanzgabe. Relative Mengen an FFA im Blut über einen Zeitraum von +110 min nach Substanzgabe. 2-way-ANOVA mit Sidak-Post-Hoc-Test. * $\hat{=}$ $p_{\text{Substanzgabe}} < 0,05$

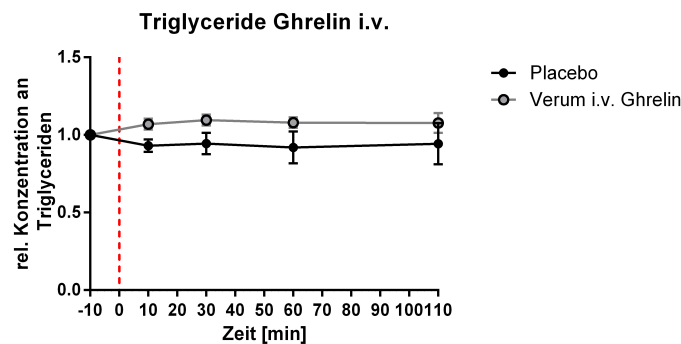


Abb. 3.14: Quantitative Entwicklung von Triglyceriden nach intravenöser Ghrelingabe. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. Normalisierung der Werte auf -10 min vor Substanzgabe. Relative Mengen an Triglyceriden im Blut über einen Zeitraum von +110 min nach Substanzgabe. 2-way-ANOVA mit Sidak-Post-Hoc-Test zeigt keine signifikanten Unterschiede.

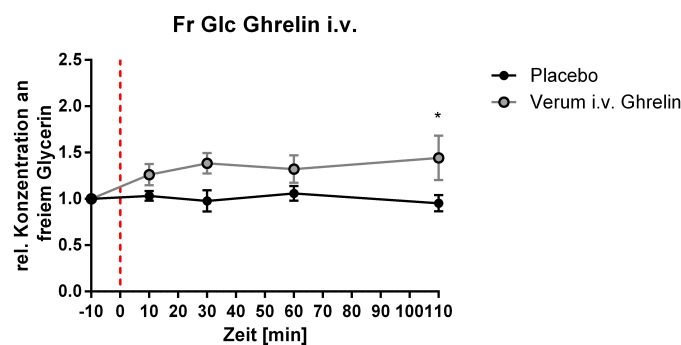


Abb. 3.15: Quantitative Entwicklung des Glycerinspiegels nach intravenöser Ghrelingabe. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. Normalisierung der Werte auf -10 min vor Substanzgabe. Relative Mengen an Glycerin im Blut über einen Zeitraum von +110 min nach Substanzgabe. 2-way-ANOVA mit Sidak-Post-Hoc-Test. * $\hat{=}$ $p_{\text{Substanzgabe}} < 0,05$

3.3.5 Auswirkungen der intravenösen Gabe von Ghrelin auf den Glukosestoffwechsel

Die Effekte der intravenösen Ghrelingabe auf die Parameter des Glukosestoffwechsels Glukose, Laktat und Insulin werden nachstehend ausgeführt.

Die Verumgabe bewirkte bis zum dritten Messzeitpunkt (+30 min) einen steileren Anstieg der Glukosekonzentration als Placebo. Im weiteren Verlauf kam es unter beiden Bedingungen zu einem flachen Abfall. Zu keinem Messzeitpunkt wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Bedingungen erreicht.

Der Laktatspiegel war nach Ghrelingabe im Vergleich zur Placebobedingung zunehmend erhöht und zum letzten Messzeitpunkt (+110 min) signifikant.

Sowohl in der Verum- als auch in der Placebobedingung zeigte sich initial ein geringer Abfall des Insulinspiegel und zum Versuchsende ein leichter Anstieg. In beiden Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

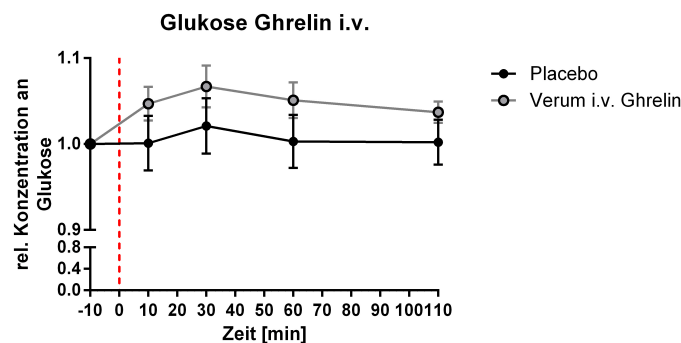


Abb. 3.16: Quantitative Entwicklung Glukosespiegels nach intravenöser Ghrelingabe. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. Normalisierung der Werte auf -10 min vor Substanzgabe. Relative Mengen an Glukose im Blut über einen Zeitraum von 110 min nach Substanzgabe. 2-way-ANOVA mit Sidak-Post-Hoc-Test zeigt keine signifikanten Unterschiede.

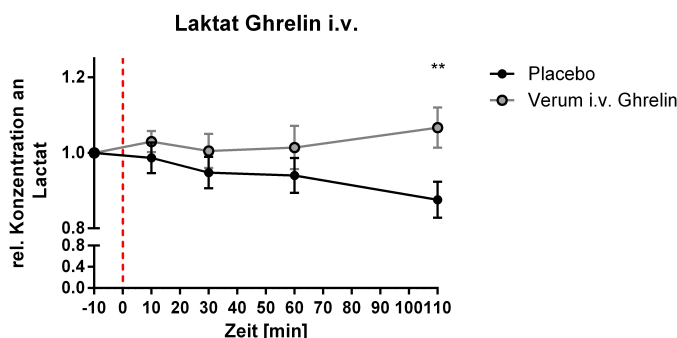


Abb. 3.17: Quantitative Entwicklung des Laktatspiegels nach intravenöser Ghrelingabe. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. Normalisierung der Werte auf -10 min vor Substanzgabe. Relative Mengen an Laktat im Blut über einen Zeitraum von 110 min nach Substanzgabe. 2-way-ANOVA mit Sidak-Post-Hoc-Test. ** $\hat{=}$ $p_{\text{Substanzgabe}} < 0,01$

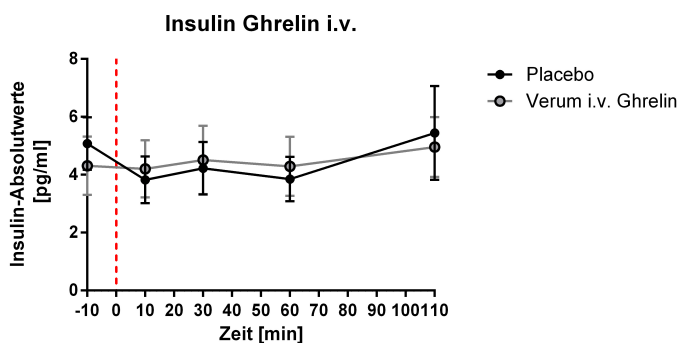


Abb. 3.18: Quantitative Entwicklung des Insulinspiegels nach intravenöser Ghrelingabe. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. Normalisierung der Werte auf -10 min vor Substanzgabe. Absolute Mengen an Insulin im Blut über einen Zeitraum von 110 min nach Substanzgabe. 2-way-ANOVA mit Sidak-Post-Hoc-Test zeigt keine signifikanten Unterschiede.

3.3.6 ACTH, GH, Kortisol und Katecholamine

Untersucht wurden die Effekte der intravenösen Ghrelingabe auf die Hormone ACTH, GH, Kortisol und Katecholamine im Vergleich zur Placebobedingung.

Mit einer Latenz von 30 Minuten kam es zu einem maximalen Anstieg der GH - Konzentration im Plasma auf das 15fache im Vergleich zum Vorinjektionswert.

ACTH reagierte nach Verumgabe mit einem signifikanten Anstieg zum dritten Messzeitpunkt auf das 5,5fache. Hinsichtlich des Kortisolspiegels war eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Placebobedingung zu den letzten Messzeitpunkten zu erheben.

Nach intravenöser Ghrelingabe konnte ein maximaler Anstieg der AdrenalinKonzentration zum zweiten Messpunkt (+10 min) um das 6,5fache im Vergleich zum Vorinjek-

tionswert verzeichnet werden. Im weiteren Verlauf fielen die Werte ab. Zum letzten Messzeitpunkt (+110 min) waren die Spiegel unter beiden Bedingungen nahezu auf gleicher Höhe. Der Adrenalinpiegel war sowohl zum zweiten (+10 min) als auch zum dritten Messpunkt (+30 min) signifikant erhöht.

Hinsichtlich des Noradrenalinpegels konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Bedingungen festgestellt werden. Dieses Muster der Katecholaminantwort konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden [110].

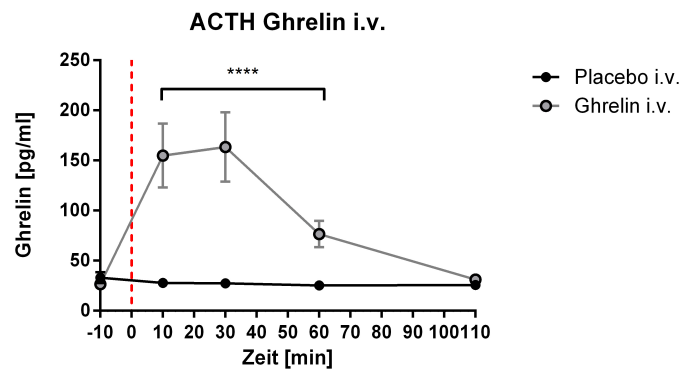


Abb. 3.19: ACTH-Werte während des Versuchs in pg/ml. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. 2-way-ANOVA mit Sidak- Post-Hoc-Test. **** $\hat{=}$ $p_{\text{Substanzgabe}} < 0,0001$ für Vergleich zwischen intravenöser Substratgabe und Placebo.

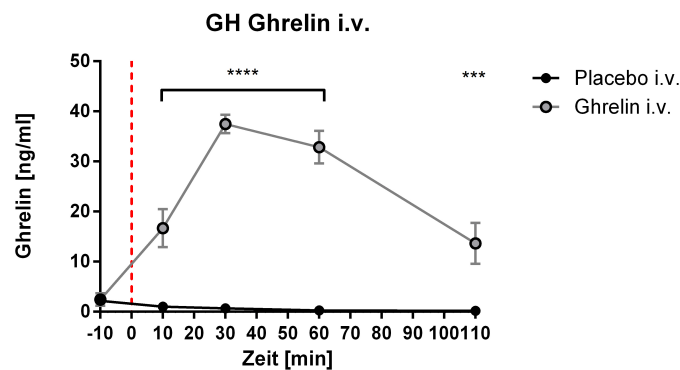


Abb. 3.20: GH-Werte während des Versuchs in ng/ml. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. 2-way-ANOVA mit Sidak- Post-Hoc-Test. **** $\hat{=}$ $p_{\text{Substanzgabe}} < 0,0001$ und *** $\hat{=}$ $p_{\text{Substanzgabe}} < 0,001$ für Vergleich zwischen intravenöser Substratgabe und Placebo.

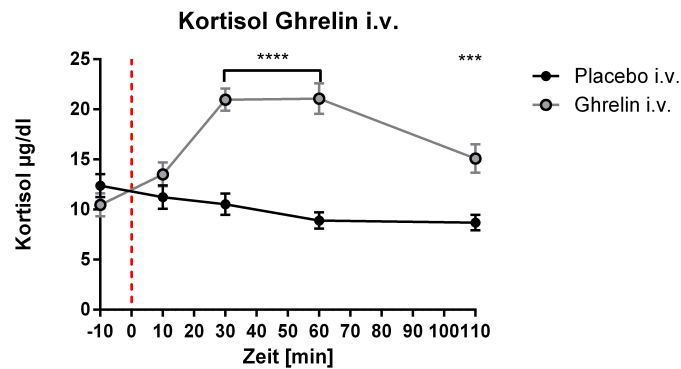


Abb. 3.21: Kortisol-Werte während des Versuchs in $\mu\text{g}/\text{dl}$. Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. 2-way-ANOVA mit Sidak- Post-Hoc-Test. **** $\hat{=}$ $p_{\text{Substanzgabe}} < 0,0001$ und *** $\hat{=}$ $p_{\text{Substanzgabe}} < 0,001$ für Vergleich zwischen intravenöser Substratgabe und Placebo.

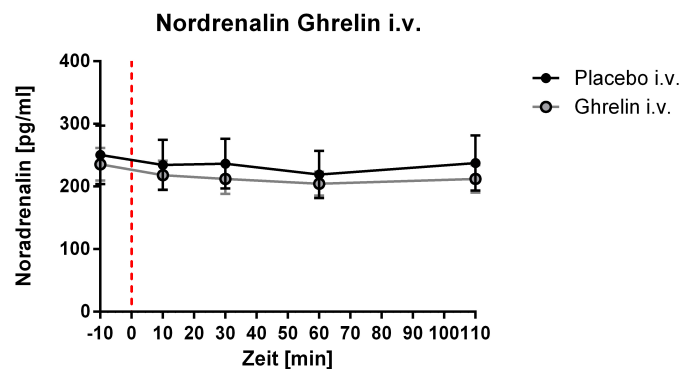


Abb. 3.22: Noradrenalin-Werte während des Versuchs in pg/ml . Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. 2-way-ANOVA mit Sidak- Post-Hoc-Test.

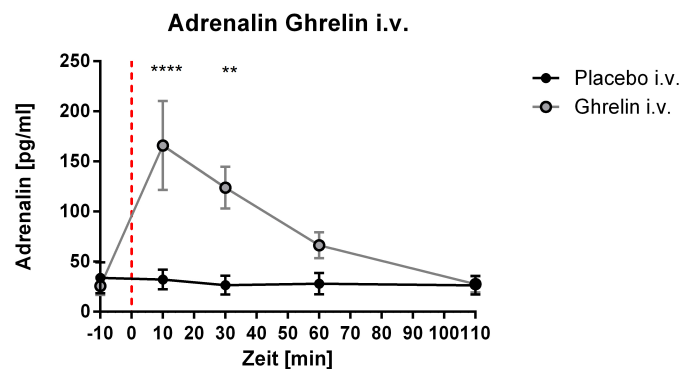


Abb. 3.23: Adrenalin-Werte während des Versuchs in pg/ml . Vertikale, gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Substanzgabe. 2-way-ANOVA mit Sidak- Post-Hoc-Test. **** $\hat{=}$ $p_{\text{Substanzgabe}} < 0,0001$ und ** $\hat{=}$ $p_{\text{Substanzgabe}} < 0,01$ für Vergleich zwischen intravenöser Substratgabe und Placebo.

3.4 HOMA-Index

Sowohl in der Leptin- als auch in der Ghrelinstudie lagen die HOMA-Indices in allen Bedingungen (Placebo- und Verumgabe) und zu allen Zeitpunkten unter 2. Dieser Wert entspricht dem Stadium 1 des HOMA-Verfahren. Eine Insulinresistenz ist daher zu jedem Zeitpunkt und jeder Bedingung beider Studien unwahrscheinlich (ANOVA).

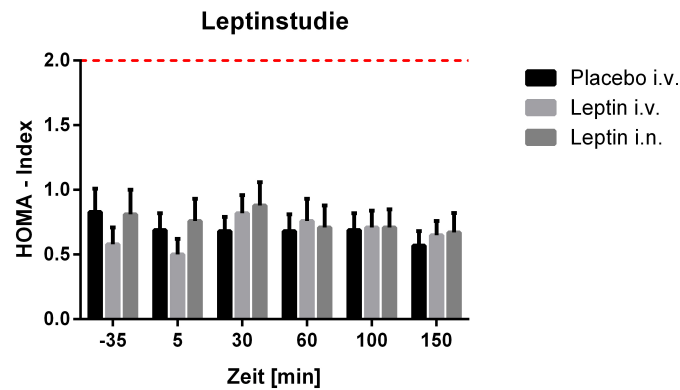


Abb. 3.24: HOMA-Indices während des Leptinversuchs. Die horizontale, gestrichelte Linie markiert die Schwellenwert der Stadien I und II.

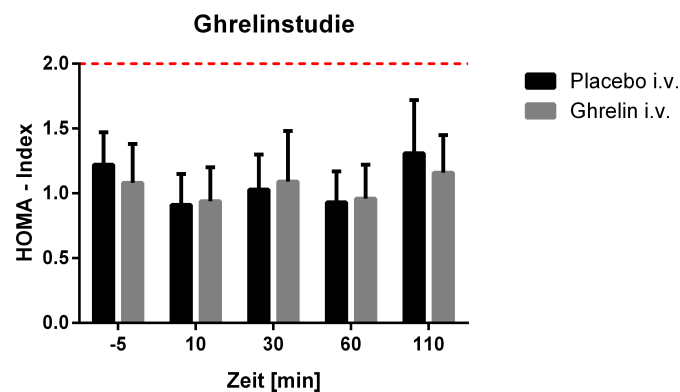


Abb. 3.25: HOMA-Indices während des Ghrelinersuchs. Die horizontale, gestrichelte Linie markiert die Schwellenwert der Stadien I und II.

3.5 Synopsis

Nach intravenöser Leptinapplikation zeigte sich eine Erhöhung des Glukosespiegels ohne Änderung der Insulinsensitivität (HOMA), hingegen keine Änderung der Lipolyseparameter. Signifikante, akute Effekte nach intranasaler Leptingabe fanden sich nicht. Die intravenöse Gabe von Ghrelin resultierte in einen Anstieg der Lipolyseparameter. Signifikante Unterschiede des Glukosespiegels konnten nicht festgestellt werden.

Tab. 3.7: Akute Effekte der hormonellen Antagonisten im Vergleich

	Leptin i.v.	Leptin i.n.	Ghrelin
Direkte Fettstoffwechseleffekte			
Lipolyse	⇔	⇔	↑
Direkte Glukosestoffwechseleffekte			
Glukosespiegel	↑	⇔	⇔

4 Diskussion

4.1 Leptin, Ghrelin und Energiehomöostase

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die akuten Effekte der Hormone Leptin und Ghrelin auf den Glukose- und Fettstoffwechsel bei jungen gesunden Probanden zu untersuchen. In der Literatur werden Leptin und Ghrelin im Hinblick auf die Energiehomöostase als funktionelle Antagonisten beschrieben. Die Datenlage der langfristigen Auswirkungen auf den Metabolismus ist unumstritten. Als orexigenes Peptidhormon hemmt Ghrelin die Lipolyse und bewirkt einen Anstieg des Glukosespiegels. Das anorexigene Proteohormon Leptin hingegen stimuliert die Lipolyse und senkt den Glukosespiegel im Blut. Die bisherige Datenmenge zu den Akuteffekten in Humanstudien ist allerdings gering und zeigt im Vergleich zu den chronischen Effekten zum Teil konträre Ergebnisse.

Im Folgenden werden die Hauptbefunde der i.v. und i.n. Leptin- und i.v. Ghrelingabe auf den Fett- und Glukosestoffwechsel wie in der Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Die intravenöse Applikation des anorexigenen Hormons Leptin führte zu keinen signifikanten Änderungen der Lipolyseparameter. Diskutiert werden kann eine vorwiegend indirekte, zentralnervöse statt direkte Wirkung auf den Fettstoffwechsel mit verminderter Nahrungsaufnahme oder eine unmittelbare Verstoffwechslung der zu messenden Lipolyseprodukte. Darüber hinaus resultierte eine Hyperleptinämie in einer signifikanten Erhöhung des Glukosespiegels ohne Veränderung der Insulinsensitivität (HOMA), möglicherweise infolge einer erhöhten hepatischen Glukoseproduktion oder einer verminderten Glukoseaufnahme in das periphere Gewebe. Die intranasale Leptingabe zeigte keine Veränderungen hinsichtlich der Stoffwechselprodukte.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Erhöhung von Lipolyseparametern (FFA und freies Glycerin) nach i.v. Ghrelingabe deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen die Akuteffekte des Hormons untersucht wurden. In Zusammenschau mit den Studien, welche die chronischen Auswirkungen untersuchten, entsteht so die Theorie eines zweiphasischen Modells, in dem in der Akutphase die lipolytischen und langfristig die adipogenetische Effekte von Ghrelin überwiegen. Allerdings zeigten so-

wohl der Glukose- als auch der Insulinspiegel nach i.v. Ghrelingabe keine signifikanten Änderungen.

Für die Bewertung dieser Ergebnisse müssen einige grundlegende Aspekte nachfolgend reflektiert werden.

4.2 Leptin

4.2.1 Leptinspiegel im Versuch

Die Applikation des Proteohormons erfolgte unter Verumbedingung entweder intravenös oder intranasal. Die intravenöse Gabe kann in der Theorie sowohl zentralnervös vermittelte als auch periphere Effekte bewirken. Leptin überschreitet die Bluthirnschranke mittels rezeptorvermittelten Transports. Als Haupttransporter fungiert bei Erwachsenen die Kurzform des Leptinrezeptors ObRa [21]. Da der Rezeptor ab einer bestimmten Konzentration eine vollständige Sättigung aufweist, sind nach intravenöser Leptingabe sowohl der zentralnervöse Spiegel als auch die zentralen Effekte begrenzt [12]. In unserer Studie wurde nach intravenöser Bolusgabe ein Leptinserumspiegel erreicht (maximaler Durchschnittswert: 708 ng/ml), welcher deutlich über das physiologische Maß hinausgeht. Zum Vergleich lagen in einer Studie von Westerterp-Plantenga die Baselinewerte von männlichen Erwachsenen mit einem $BMI \geq 27 \frac{kg}{m^2}$, welcher mit einem erhöhten Leptinspiegel korreliert, bei ca. 20 ng/ml. Die meisten Interventionsstudien an Probanden verfolgten das Ziel, langfristige Effekte zu untersuchen. Vor diesem Hintergrund erfolgte die Substanzapplikation vorwiegend subkutan, um eine langsame und verlängerte Substanzfreisetzung sicherzustellen. In der Absicht, auch die Akuteffekte abzubilden, entschied sich die Arbeitsgruppe Wolsk et al. in einem Experiment an jungen gesunden Probanden für eine intravenöse Infusion. Die maximal erzielten Leptinspiegel nach Verumgabe waren vergleichbar mit denen adipöser Probanden [151]. Die in der vorliegenden Studie angewandte Bolusgabe hat nachweislich zu supraphysiologischen Leptinspiegeln geführt. Auf diese Weise sind noch schnellere und deutlichere metabolische Veränderungen zu erwarten.

Unser Studiendesign erlaubt keine Aussage über den zentralnervösen Spiegel. Dennoch ist anzunehmen, dass bei Sättigung des Leptintransporters die Ergebnisse mit hoher Wahrscheinlichkeit zusätzlich auf die peripheren Effekte zurückzuführen sind.

Die intranasale Applikationsform wurde gewählt, um die vorwiegend zentralnervös vermittelten Effekte getrennt von peripheren Effekten zu untersuchen. Studien an normalgewichtigen und adipösen Ratten haben gezeigt, dass intranasale Leptingabe zu

einer Appetitreduktion und Gewichtsabnahme führt [49, 130]. Der in unserem Experiment ersichtliche, im Vergleich zur intravenösen Verumgabe deutlich geringere Anstieg von Leptin im Blutserum ist Ausdruck der geringen mukosalen Resorption [154]. Es ist folglich davon auszugehen, dass die Ergebnisse nach intranasaler Substanzgabe weniger Rückschlüsse auf die peripheren Effekte zulassen als nach intravenöser Gabe. Eine zentralnervöse Wirkung lässt sich nur vermuten, da keine Leptinmessung im ZNS erbracht wurde.

4.2.2 Akute Effekte auf die Lipolyse

Die vorliegende Studie zeigte weder nach intravenöser noch nach intranasaler Leptingabe signifikante Änderungen verglichen mit der Placebobedingung hinsichtlich der Fettstoffwechselfparameter FFA, Triglyceride und freies Glycerin im Blut. Ein Effekt auf die Lipolyse innerhalb des angesetzten Untersuchungszeitraums nach Substanzgabe (150 min) lässt sich somit zunächst nicht ableiten. Damit einher gehen die ausbleibenden Veränderungen auf die lipolysestimulierenden Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin.

Unter der Annahme, dass die intravenöse Verumgabe vorwiegend periphere Auswirkungen induziert, decken sich die Ergebnisse mit einem mehrtägigen Mäuseexperiment von Prieur et al. Hier wurde gezeigt, dass die Effekte auf den Lipidmetabolismus nicht direkt, sondern anorexigen über eine verminderte Nahrungsaufnahme erfolgen [119]. Auch eine Studie an übergewichtigen Männern kam zu dem Schluss, dass die metabolischen Effekte vermutlich vielmehr über das ZNS vermittelt werden. Männliche Probanden wurden über mehrere Wochen einer limitierten Nahrungsaufnahme unterzogen und erhielten subkutan appliziertes Leptin. Es zeigten sich keine Unterschiede bezüglich Energieverbrauch und Gewichtsabnahme gegenüber der Placebokontrolle [149]. Allerdings weist ein Großteil der Ergebnisse aus *in-vitro* und *in vivo* Studien darauf hin, dass Leptin einen direkten Effekt auf den peripheren muskulären Fettmetabolismus ausübt. Eine Studie an der Skelettmuskulatur von Ratten beispielsweise zeigte nach langfristiger, subkutaner Leptinapplikation neben der Erhöhung der β -Oxidation von Fettsäuren einen Anstieg der Triglyceridhydrolyse [136]. Wolsk et al. kamen in einem Experiment mit einem zu der vorliegenden Studie sehr ähnlichen Probandenkollektiv zu dem Ergebnis, dass intravenös verabreichtes Leptin die Lipolyse akut stimuliert [151]. Unter der Annahme, dass Leptin die Triglyceridspaltung unmittelbar nach Substanzgabe induziert, lassen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit zwei verschiedenen Erklärungsansätzen deuten. Zum einen wäre eine Aktivierung einer negativen Rückkopplung, möglicherweise als gegenregulatorischer Mechanismus auf den supraphysiologischen Leptinspiegel denkbar, sodass die Lipolyseprodukte Glycerin und die freien

Fettsäuren unmittelbar nach Bildung in die Fettsäuresynthese eingebunden werden. Zum anderen ist ein weiterer Abbau der Metaboliten denkbar. Unterstützt wird letztgenannte Hypothese durch oben aufgeführte Studien von Steinberg und Wolsk, welche Hinweise auf eine leptininduzierte Fettsäureoxidation liefern.

Es ist fraglich, ob die Erklärungsansätze ebenfalls auf die ausbleibenden Änderungen nach intranasaler Leptingabe anzuwenden sind. Zwar wurde nach Gabe zu einem Zeitpunkt eine signifikante Erhöhung der Leptinkonzentration im Blut als indirekte Positivkontrolle der Applikationsform nachgewiesen, doch ist die Aussagekraft bei in der vorliegenden Studie nicht erbrachtem Hormonnachweis im ZNS hinsichtlich der zentralnervösen Auswirkungen limitiert.

4.2.3 Akute Effekte auf den Glukosestoffwechsel

Nach intravenöser Leptinapplikation zeigte sich zu mehreren Messzeitpunkten eine signifikante Erhöhung des Glukosespiegels im Vergleich zur Placebokontrolle. Der erhöhte Glukosespiegel könnte entweder mit einer gesteigerten, hepatischen Glukoneogenese/-Glykogenolyse oder einer verminderten Glukoseaufnahme in das periphere Gewebe erklärt werden. Der Laktatspiegel war zum vorletzten Messzeitpunkt signifikant reduziert, zu allen anderen Messzeiten nach intravenöser Verumgabe in der Tendenz erniedrigt. Da Laktat eines der Ausgangssubstrate der Glukoneogenese und ein Endprodukt der Glykolyse darstellt, können die Änderungen des Laktatspiegels als Folge der Erhöhung der Glukosesynthese bzw. Verminderung des Glukoseabbaus interpretiert werden. Die vorliegenden Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu zahlreichen Studien, welche vorwiegend an Zellen oder Tieren durchgeführt wurden und chronische Effekte betrachteten. Bei Tieren mit diabetischer Stoffwechsellaage, Adipositas oder einem Leptin-Gendefekt wurde ein glukosenkender Effekt beobachtet [41]. In einer Studie an nicht adipösen Typ-1-Diabetes-Mäusen konnte gezeigt werden, dass Leptin den Glukosespiegel durch die Unterdrückung einer Hyperglucagonämie senkt [148]. Studien, welche die akuten Effekte untersuchten, kamen in Hinsicht auf die Glukosewerte im Plasma in Bezug zur vorliegenden Arbeit ebenfalls zu anderen Ergebnissen. Rossetti et al. fanden in einem Tiermodell heraus, dass der Glukosespiegel im Blut zu keinem Zeitpunkt des Experiments signifikant verändert war, obgleich im gleichen Versuch geschlussfolgert wurde, dass eine akute Erhöhung des Plasmaleptinspiegels die Fähigkeit von Insulin verstärkt, die hepatische Glukoseproduktion zu hemmen [124]. In der oben beschriebene Humanstudie von Wolsk et al. waren keine akuten Änderungen des Glukosespiegels zu verzeichnen, hingegen ein Abfall des Insulinsspiegels [151]. In der vorliegenden Studie liegen keine Signifikanzen hinsichtlich des Insulinsspiegels vor. Es ist dennoch denkbar, dass in der Akutphase, insbesondere nach supraphysiologischer

Leptingabe, eine Erhöhung des Glukosespiegels durch einen Abfall des Insulinspiegels dem glukosenenkenden Effekt von Leptin überwiegen kann. Eine leptininduzierte Insulinresistenz ist bei einem durchgängig ermittelten HOMA-Index von unter 2 nicht als Erklärung für die erhöhten Glukosewerte anzunehmen.

Während zentral verabreichtes Leptin in zahlreichen Studien Auswirkungen auf die Glukosehomöostase im Blut gezeigt hat [53, 81], konnte in dieser Studie nach intranasaler Leptingabe kein Effekt auf die Glukoseparameter konstatiert werden. Wie bereits oben ausgeführt hätte eine zentrale Hormonbestimmung als Positivkontrolle helfen können, die vorliegenden Ergebnisse besser zu deuten. Jedoch müsste zur Gewinnung von Zerebrospinalflüssigkeit eine Lumbalpunktion durchgeführt werden, welche sich im vorliegenden Studiendesign als große technische Hürde und ethisch grenzwertiges Risiko dargestellt hätte.

4.3 Ghrelin

4.3.1 Ghrelinspiegel im Versuch

Die Differenz zwischen dem maximalen Ghrelinspiegel im Blut vor Nahrungsaufnahme und dem Tiefstwert nach Nahrungsaufnahme beläuft sich unter physiologischen Bedingungen auf das Zweifache [34]. Bei krankheitsbedingter Mangelernährung kann der Unterscheid auf das Dreifache ansteigen. Luzidi et al. haben in Studie an gesunden, normgewichtigen Probanden den Einfluss der Erhöhung des Plasmaghrelinspiegels auf das Zwei- bis Dreifache untersucht. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass zahlreiche Parameter des Glukose- und Lipidmetabolismus, wie Glukose, Insulin, Glucagon sowie freie Fettsäuren im Blut keine signifikante Änderung erfuhren [91]. Der in der vorliegenden Arbeit bestimmte Anstieg des Ghrelinspiegels auf das 18fache liegt jedoch deutlich über dem physiologischen Maß. Analog zur Leptinstudie sollen Stoffwechseländerungen auf diese Weise deutlicher zum Vorschein gebracht werden. Ein Teil der nachfolgenden Ergebnisse kann so erklärt werden.

4.3.2 Akute Effekte auf die Lipolyse

FFA und freies Glycerin waren verglichen zur Placebobedingung in der Post-Hoc-Analyse der 2-way-ANOVA jeweils zu einem Zeitpunkt nach Gabe des in unserer Studie verwendeten acetylierten Ghrelins signifikant erhöht. Auch wenn der Triglyceridspiegel sich zu keinem Zeitpunkt signifikant änderte, deuten die Ergebnisse auf eine ghrelinvermit-

telte Stimulation der Lipolyse hin. Die vorliegenden Daten decken sich mit Resultaten aus Studien an gesunden männlichen Probanden, denen acetyliertes Ghrelin intraarteriell oder intravenös verabreicht wurde [144–146]. Die akuten Effekte können zum Teil über den in der vorliegenden Arbeit bestätigten Anstieg der Lipolyse-stimulierenden Hormone Adrenalin, GH, ACTH und Cortisol erklärt werden [64, 110, 122, 157]. Zudem beruht die lipolytische Wirkung von Ghrelin auch auf Mechanismen, welche unabhängig von den genannten Hormonen wirken [144, 145]. Bei langfristiger Gabe überwiegt die adipogene Wirkung des Ghrelins. In weißen Fettzellen stimuliert das Peptidhormon nach intracerebroventrikulärer Gabe die mRNA-Expression von Enzymen, welche die Einlagerung von Lipiden fördern, und hemmt die Expression von Enzymen, welche die β -Oxidation katalysieren [140]. Ähnliche Veränderungen der Genexpression wurden nach subkutaner Injektion an Rattenleber und -muskeln gezeigt [14]. Eine Erklärung für die vorhandenen Ergebnisse könnte ein zweiphasisches Modell liefern. In der Akutphase überwiegen die lipolytischen Effekte, welche vorwiegend hormonell induziert werden. Langfristig verschieben sich die metabolischen Veränderungen zu Gunsten der Adipogenese, welche Folge vor allem von Veränderungen in der Genexpression darstellt. Den zeitlichen Umschlagspunkt von Lipolyse zur Lipogenese konnte die vorliegende Arbeit nicht zeigen. Jedoch ist zu vermuten, dass ein auf einen längeren Zeitraum ausgelegter Versuchsaufbau die Frage nach dem Übergang beantworten könnte.

4.3.3 Akute Effekte auf den Glukosestoffwechsel

Die Mehrheit der *in vivo*- und *in vitro* Studien deuten daraufhin, dass Ghrelin den Plasmaglukosespiegel erhöht und den Insulinspiegel senkt [143]. In einem Versuch an jungen, gesunden Probanden konnte der hyperglykämische und Insulinsenkende Effekt auch in der Akutphase bestätigt werden [22]. Die vorliegende Studie zeigte allerdings keine signifikanten Veränderungen auf den Glukose- und Insulinspiegel. Zum Ende des Versuchszeitraums konnte lediglich ein signifikant erhöhter Laktatspiegel nachgewiesen werden. Allerdings sind die Laktatwerte in Anbetracht der unveränderten, übrigen Glukosestoffwechselfparameter nicht sicher einzuordnen.

Zu einem unserer Arbeit ähnlichen Ergebnis kamen Vestergaard et al., welche in einer Humanstudie keinen Einfluss der intraarteriellen Ghrelininfusion auf den Glukosemetabolismus an der Skelettmuskulatur fanden. In gleicher Studie wurde ein signifikanter Anstieg von desacetyliertem Ghrelin festgestellt, welches über unbekannte Mechanismen im Vergleich zur acetylierten Form gegenteilige Effekte auf den Glukose- und Insulinspiegel ausübt [144]. Die vorliegenden Resultate lassen die Interpretation zu, dass die hyperglykämischen Effekte, welche durch die stimulierte Erhöhung kontrainsulinärer Hormone (ACTH, GH, Cortisol) hervorgerufen werden, durch die glukoseenken-

de Wirkung des mutmaßlich gleichsam erhöhten desacetylierten Ghrelins aufgehoben werden. Die Diskrepanz zu den in den meisten Studien beschriebenen Ergebnissen lässt sich nicht abschließend klären. Allerdings hebt sich die vorliegende Arbeit im Vergleich zu vielen anderen Experimenten insbesondere durch die Untersuchungsgruppe und den definierten Zeitraum ab. Die Untersuchung erfolgte an einem Probandenkollektiv, im Besonderen an jungen, männlichen, gesunden Personen, der Untersuchungszeitraum umfasste die Akutphase der Metabolismuswirkungen. Es ist daher zu vermuten, dass sich Erkenntnisse aus Zellkulturen oder Tierstudien nicht direkt auf den Menschen übertragen lassen und/oder die Effekte zu verschiedenen Zeitpunkten variieren können.

Die in der vorliegenden Studie angewandte Methodik erfasst Momentaufnahmen des Glukosespiegels im Blut. Eine zusätzliche Bestimmung des Glukoseumsatzes erlaubt eine dynamischere Betrachtung des Glukosemetabolismus. Als Grundlage hierfür kann in Folgestudien die Methode der plasma rate of appearance (R_a) angewandt werden, bei der aus der Anreicherung eines im Vorfeld infundierten Glukoseisotops der Glukoseumsatz berechnet wird.

4.4 Synopsis der Leptin- und Ghrelinstudie

Die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase spielt für das Überleben von Organismen eine entscheidende Rolle. Aus diesem Grunde haben sich zahlreiche komplexe Mechanismen entwickelt, welche die Aufnahme und den Verbrauch von Energie koordinieren. Das Gehirn, insbesondere der Hypothalamus, als zentrale Schaltstelle erhält kontinuierlich Informationen über den Nährstoffgehalt der Energiespeicher und den basalen und situativen Energieverbrauch. Als Informationsträger fungieren metabolische Hormone. Die vorliegende Studie hat sich auf Leptin als Vertreter der anorexigenen und Ghrelin als Vertreter der orexigenen Hormone fokussiert. Beide Botenstoffe werden in der Literatur als funktionelle Antagonisten hinsichtlich chronischer metabolischer Effekte beschrieben. Während Leptin die Lipolyse stimuliert und den Glukosespiegel senkt, wird die Lipolyse von Ghrelin gesenkt und der Glukosespiegel gesteigert. Inwiefern sich die Hormone in der Akutphase funktionell gegenüberstehen, ist ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit. Die Literatur bietet hierfür viele Daten, die jedoch sehr widersprüchlich sind und vor allem auf Zellkulturen und Tierstudien basieren. Es wurde in den vorliegenden Experimenten gezeigt, dass Leptin keine Auswirkung auf die Lipolyseparameter hat und den Glukosespiegel erhöht und dass Ghrelin die Lipolyse stimuliert und den Glukosespiegel nicht verändert. Die funktionell antagonisierende Wirkung der Hormone bezogen auf den Fett- und Glukosestoffwechsel war in der Akutphase dem-

zufolge nicht zu beobachten. Darüber hinaus können zwei weitere Schlussfolgerungen gezogen werden. Einerseits kann gezeigt werden, dass die akuten und chronischen Effekte nicht unmittelbar gleichzusetzen sind. Andererseits lassen sich die Ergebnisse aus experimentellen Modellsystemen nicht auf den Menschen übertragen.

Ein Ungleichgewicht des Energiehaushalts kann zu verschiedenen Ernährungs- und Stoffwechselkrankheiten führen wie Adipositas. Auch wenn der Fortschritt einer effektiven medikamentösen Therapie der Fettleibigkeit sehr langsam voranschreitet, kann ein besseres Verständnis der zentralen Regulation der Energiehomöostase in Zukunft nützliche Behandlungsoptionen offenbaren. Diese Arbeit als Pilotstudie vieler weiterer Projekte (s.u.) hat nicht den Anspruch, dass direkt klinische Konsequenzen abgeleitet werden. Sie soll vielmehr die Grundlagen schaffen, zunächst die Aufrechterhaltung, in weiteren Studien das Abweichen der Energiehomöostase besser zu verstehen.

4.5 Limitationen

Eine Limitation der vorliegenden Arbeit stellt die geringe Anzahl an Probanden dar (jeweils $n=12$ für Leptin- und Ghrelinstudie). Das ausgewählte randomisiert kontrollierte within-subject-Design mit jeweils hochstandardisierten Protokollen und die Normalisierung der Laborwerte auf die Ausgangswerte vor Substanz-/Placebogabe ermöglichten dennoch die Durchführung der Versuche mit validen Aussagen. Zu diesem Zweck wurde im Vorfeld für die Hauptparameter eine Poweranalyse mit G*Power 3.1.3 durchgeführt [47]. Darüber hinaus wurden die Studien lediglich an männlichen Probanden durchgeführt. Experimente mit weiblichen Versuchsteilnehmern sind aufwändiger in der Durchführung. Da der Leptinspiegel im Blut in Abhängigkeit von den Phasen des Menstruationszyklus variiert [8], muss die Planung und Interpretation der Versuche stets unter Berücksichtigung des hormonellen Status erfolgen. Als weitere Einschränkung ist der pharmakologische Charakter (16facher Ghrelinspiegel zur Baseline in der Ghrelinstudie, 200facher Leptinspiegel zur Baseline in der Leptinstudie (i.v.)) der vorliegenden Humanstudie zu nennen. Die beobachteten Ergebnisse spiegeln somit nicht zwangsläufig die physiologischen Effekte der Hormone wider. Jedoch wurden die eklatanten Dosen verwendet, um grundsätzlich Auswirkungen zu provozieren. Das Ziel der Arbeit bestand nicht in der Simulation eines physiologischen Niveaus, sondern in der Erzeugung von Grundsatzaussagen.

Diese Arbeit setzt sich aus zwei Studien mit separaten Probandenkollektiven zusammen. Daher konnten die untersuchten Hormone zwar inhaltlich, jedoch nicht direkt statistisch miteinander verglichen werden. Ungeachtet dessen können die Fragestellungen bei gleichen Einschlusskriterien der Probanden ausreichend beantwortet werden.

Darüber hinaus können Interaktionen mit den Methoden des zweiten Forschungsgebiets der Gesamtstudie, der Untersuchung des autonomen Nervensystems, nicht ausgeschlossen werden, insbesondere die wiederholt durchgeführten Apnoemanöver und Barorezeptortests könnten die untersuchten Stoffwechselfparameter über eine Aktivierung vegetativer Nervenbahnen beeinflussen. Eine Erhöhung der Katecholamine beispielsweise kann unabhängig von der Hormongabe in einer Steigerung der Lipolyse resultieren [25]. Die potentiellen Confounder bestanden in beiden Versuchsbedingungen gleichermaßen und dürften somit aufgrund des standardisierten Ablaufs und within-subject Vergleichs gegeneinander aufgewogen werden.

4.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit versteht sich als Pilotstudie zur Untersuchung von Leptin- und Ghrelineffekten auf den Glukose- und Lipidmetabolismus. Hierbei sollen zunächst an jungen, gesunden Probanden die Grundhypothesen, die vornehmlich aus Tier- und Labormodellen stammen, überprüft werden. Die Verwendung supraphysiologischer Dosen ermöglicht hierbei eine Simulation des gestörten Hormonhaushalts, welcher bei vielen Menschen mit Adipositas beschrieben wurde. Der nächste Schritt zum Verständnis einer gestörten Energiehomöostase stellt die Untersuchung von gewichtsspezifischen Unterschieden dar, welche in einer Folgestudie mit adipösen Probanden erarbeitet werden sollen. Auch zur Ermittlung geschlechts- und altersspezifischer Unterschiede müssen weitere Probandenkollektive einbezogen werden.

Zudem sind weitere Studien erforderlich, um die Mechanismen hinter den beschriebenen Veränderungen zu verstehen. Als eine wichtige weiterführende Methode ist die Fettgewebsbiopsie mit Analyse der molekularen Mechanismen zu nennen, um die Veränderungen auf der Transkriptionsebene zu beleuchten. Auf diese Weise ist beispielsweise die Bestimmung von Schlüsselenzymen, welche den Glukose- und Lipidstoffwechsel beeinflussen, sinnvoll, um die Ursachen für die Veränderungen der metabolischen Parameter zu finden. Ein weiteres Verfahren ist die Bestimmung der rate of appearance von deuteriertem Glycerol ($Ra_{Glycerol}$), um die systemische Lipolyse vor und nach intravenöser Ghrelingabe bzw. intravenöser oder intranasaler Leptingabe vs. Placebo abzuschätzen. Wie in der Arbeit von Iwen et al. beschrieben erfordert dies die intravenöse Infusion von deuteriertem Glycerol mit konstanter Rate und die Bestimmung der Isotop-Anreicherung mittels gaschromatographischer Massenspektrometrie [73]. Über die Formel

Basale Infusionsrate des Isotops $\times \left(\frac{\text{Glycerolinfusatanreicherung}}{\text{'steady state' basale Plasmaglycerolanreicherung}} - 1 \right)$

könnte dann die $Ra_{Glycerol}$ errechnet und in Beziehung zu den in dieser Arbeit erfassten Parametern gesetzt werden.

Darüber hinaus sollten Folgestudien einen längeren Versuchszeitraum abdecken, um einen möglichen Umschlagspunkt der akuten zu den chronischen Effekten zu determinieren.

Aus den o.g. Ansätzen lassen sich weitere Fragen ableiten:

1. Welche Auswirkungen haben Leptin und Ghrelin auf den Glukose- und Fettstoffwechsel bei adipösen, weiblichen und/oder älteren Probanden?
2. Welche Mechanismen auf Transkriptionsebene liegen diesen Auswirkungen zu Grunde?
3. Wann erfolgt der zeitliche Umschlag von diskrepanten akuten und chronischen Effekten?

4.7 Beantwortung der Fragestellung

Im Folgenden sollen die im Kapitel 1.2.4 gestellten Hauptfragen beantwortet werden, ob

- sich die Veränderungen der Akutphase von den in der Literatur beschriebenen langfristigen Veränderungen unterscheiden
- Leptin und Ghrelin in der Akutphase gegensätzlich auf den Lipid- und Glukosestoffwechsel wirken.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich die Effekte in der Akutphase deutlich von den in der Literatur beschriebenen langfristigen Effekten unterscheiden. Die intravenöse Gabe von Ghrelin resultiert in einen Anstieg der Lipolyseparameter, während nach intravenöser Leptingabe keine Änderungen im Lipidstoffwechsel zu verzeichnen sind. Unter der Annahme, dass Leptin zusätzlich die β -Oxidation stimuliert, könnte postuliert werden, dass beide Hormone gleichsinnig auf den Lipidmetabolismus wirken. Der Nachweis des Einflusses auf den Fettsäureabbau wurde zwar nicht in dieser Studie, jedoch in anderen Versuchen erbracht und würde die ausbleibende Erhöhung der FFA erklären [136,151]. Zudem steigerte intravenös appliziertes Leptin wider Erwarten den Glukosespiegel im Blut. Ghrelin hingegen bewirkt keine Änderung des Glukose- und Insulinspiegels. So lässt sich auch hinsichtlich des Glukosemetabolismus keine funktionell antagonistische Wirkung der beiden Hormone ableiten. Intranasal verabreichtes Leptin zeigte keine Änderungen im Lipid- oder Glukosestoffwechsel. Es ist anzunehmen, dass der zentral-

4.7. Beantwortung der Fragestellung

nervöse Spiegel zu gering war, um metabolische Effekte sichtbar zu machen. Da eine intrazerebroventrikuläre Leptinapplikation bei Menschen nicht zu vertreten ist, könnte eine Erhöhung der intranasalen Leptindosis perspektivisch helfen, die zentralen Effekte näher zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Adipositas ist mit vielen Komorbiditäten wie Diabetes Mellitus Typ 2 oder Hyperlipidämie vergesellschaftet. Die Ursache von starkem Übergewicht liegt in einem Ungleichgewicht der Energiehomöostase zu Gunsten einer erhöhten Energiezufuhr begründet. Eine bedeutende Rolle zur Aufrechterhaltung der Balance zwischen Energiezufuhr und -aufnahme wird dem Wechselspiel verschiedener Hormone zugeschrieben. Die vorliegende Studie beleuchtet die Wirkungen des anorexigenen Leptins und des orexigenen acetylierten Ghrelins als hormonelle Gegenspieler. Die langfristigen Effekte der beiden Hormone auf den Glukose- und Lipidstoffwechsel wurden in einer Vielzahl von tierexperimentellen und einigen Humanstudien beschrieben. Hinsichtlich akuter Effekte an Menschen ist die Studienmenge bislang jedoch sehr gering und die Studienlage zum Teil uneinheitlich. Diese Arbeit verfolgte das Ziel, neue Erkenntnisse im Hinblick auf die Akutwirkung der Hormone zu schaffen.

Im Rahmen eines randomisierten, doppelblinden, balancierten, Cross-over-Designs erhielten jeweils 12 normalgewichtige, junge Männer in zwei voneinander getrennten Einzelstudien entweder einen intravenösen Leptinbolus, einen intranasalen Leptinbolus oder Placebo bzw. Ghrelin als intravenöse Bolusgabe oder Placebo. Die laborchemischen Parameter zur Bestimmung des Glukose- und Fettstoffwechsels wurden wiederholt vor und nach Substanzgabe gemessen. Die Veränderungen nach Verum- und Placebogabe wurden auf die Ausgangswerte normalisiert.

Es zeigte sich, dass intravenös appliziertes Leptin keine akute Änderung der Lipolyseparameter, jedoch eine Erhöhung des Glukosespiegels ohne Veränderung der Insulinsensitivität (HOMA) bewirkte. Die intranasale Leptinapplikation führte weder zu Änderungen im Glukosestoffwechsel noch im Lipidmetabolismus. Eine Hyperghrelinämie resultierte in einen Anstieg der Lipolyseparameter. Akute Effekte auf den Glukosestoffwechsel fanden sich nach Ghrelingabe nicht.

Die Lipolyseparameter waren nach Leptingabe unverändert, nach Ghrelingabe erhöht. Die akut lipolytische Wirkung von Ghrelin steht hierbei im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Langzeiteffekten. Hinsichtlich des Glukosestoffwechsels konnte

weder eine funktionell antagonistische noch agonistische Wirkung der beiden Hormone in der Akutphase abgeleitet werden.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit einen weiteren Baustein zum Verständnis der endokrinen Kontrolle der Energiehomöostase. In einigen Punkten hinterfragt die vorliegende Arbeit die bisherige Datenlage und ist geeignet, neue Hypothesen für humane Folgestudien zu generieren.

6 Literaturverzeichnis

- [1] ADEGHATE, E., AND PONERY, A. S. Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *J Neuroendocrinol* 14, 7 (Jul 2002), 555–60.
- [2] AKAMIZU, T., TAKAYA, K., IRAKO, T., HOSODA, H., TERAMUKAI, S., MATSUYAMA, A., TADA, H., MIURA, K., SHIMIZU, A., FUKUSHIMA, M., YOKODE, M., TANAKA, K., AND KANGAWA, K. Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. *Eur J Endocrinol* 150, 4 (Apr 2004), 447–55.
- [3] ANDERSSON, U., FILIPSSON, K., ABBOTT, C. R., WOODS, A., SMITH, K., BLOOM, S. R., CARLING, D., AND SMALL, C. J. Amp-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 279, 13 (Mar 2004), 12005–8.
- [4] ANDERWALD, C., BRABANT, G., BERNROIDER, E., HORN, R., BREHM, A., WALDHÄUSL, W., AND RODEN, M. Insulin-dependent modulation of plasma ghrelin and leptin concentrations is less pronounced in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 52, 7 (Jul 2003), 1792–8.
- [5] ANDREWS, Z. B., LIU, Z.-W., WALLINGFORD, N., ERION, D. M., BOROK, E., FRIEDMAN, J. M., TSCHÖP, M. H., SHANABROUGH, M., CLINE, G., SHULMAN, G. I., COPPOLA, A., GAO, X.-B., HORVATH, T. L., AND DIANO, S. Ucp2 mediates ghrelin's action on npy/agrp neurons by lowering free radicals. *Nature* 454, 7206 (Aug 2008), 846–51.
- [6] ARIYASU, H., TAKAYA, K., TAGAMI, T., OGAWA, Y., HOSODA, K., AKAMIZU, T., SUDA, M., KOH, T., NATSUI, K., TOYOOKA, S., SHIRAKAMI, G., USUI, T., SHIMATSU, A., DOI, K., HOSODA, H., KOJIMA, M., KANGAWA, K., AND NAKAO, K. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 10 (Oct 2001), 4753–8.
- [7] ASAKAWA, A., INUI, A., KAGA, T., KATSUURA, G., FUJIMIYA, M., FUJINO,

- M. A., AND KASUGA, M. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 52, 7 (Jul 2003), 947–52.
- [8] ASIMAKOPOULOS, B., MILOUSIS, A., GIOKA, T., KABOUROMITI, G., GIANNISLIS, G., TROUSSA, A., SIMOPOULOU, M., KATERGARI, S., TRIPSANIS, G., AND NIKOLETTOS, N. Serum pattern of circulating adipokines throughout the physiological menstrual cycle. *Endocr J* 56, 3 (2009), 425–33.
- [9] BAI, Y., ZHANG, S., KIM, K. S., LEE, J. K., AND KIM, K. H. Obese gene expression alters the ability of 30a5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones. *J Biol Chem* 271, 24 (Jun 1996), 13939–42.
- [10] BAILE, C. A., DELLA-FERA, M. A., AND MARTIN, R. J. Regulation of metabolism and body fat mass by leptin. *Annu Rev Nutr* 20 (2000), 105–27.
- [11] BALDANZI, G., FILIGHEDDU, N., CUTRUPI, S., CATAPANO, F., BONISSONI, S., FUBINI, A., MALAN, D., BAJ, G., GRANATA, R., BROGLIO, F., PAPOTTI, M., SURICO, N., BUSSOLINO, F., ISGAARD, J., DEGHENGI, R., SINIGAGLIA, F., PRAT, M., MUCCIOLI, G., GHIGO, E., AND GRAZIANI, A. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through erk1/2 and pi 3-kinase/akt. *J Cell Biol* 159, 6 (Dec 2002), 1029–37.
- [12] BANKS, W. A. Blood-brain barrier and energy balance. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5 (Aug 2006), 234S–237S.
- [13] BANKS, W. A., NIEHOFF, M. L., MARTIN, D., AND FARRELL, C. L. Leptin transport across the blood-brain barrier of the koletsky rat is not mediated by a product of the leptin receptor gene. *Brain Res* 950, 1-2 (Sep 2002), 130–6.
- [14] BARAZZONI, R., BOSUTTI, A., STEBEL, M., CATTIN, M. R., RODER, E., VISINTIN, L., CATTIN, L., BIOLO, G., ZANETTI, M., AND GUARNIERI, G. Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, 1 (Jan 2005), E228–35.
- [15] BARAZZONI, R., ZANETTI, M., CATTIN, M. R., VISINTIN, L., VINCI, P., CATTIN, L., STEBEL, M., AND GUARNIERI, G. Ghrelin enhances in vivo skeletal muscle but not liver akt signaling in rats. *Obesity (Silver Spring)* 15, 11 (Nov 2007), 2614–23.
- [16] BARTNESS, T. J., KAY SONG, C., SHI, H., BOWERS, R. R., AND FOSTER, M. T. Brain-adipose tissue cross talk. *Proc Nutr Soc* 64, 1 (Feb 2005), 53–64.
- [17] BARTNESS, T. J., SHRESTHA, Y. B., VAUGHAN, C. H., SCHWARTZ, G. J.,

- AND SONG, C. K. Sensory and sympathetic nervous system control of white adipose tissue lipolysis. *Mol Cell Endocrinol* 318, 1-2 (Apr 2010), 34–43.
- [18] BEAUMONT, N. J., SKINNER, V. O., TAN, T. M.-M., RAMESH, B. S., BYRNE, D. J., MACCOLL, G. S., KEEN, J. N., BOULOUX, P. M., MIKHAILIDIS, D. P., BRUCKDORFER, K. R., VANDERPUMP, M. P., AND SRAI, K. S. Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J Biol Chem* 278, 11 (Mar 2003), 8877–80.
- [19] BJØRBAEK, C., ELMQUIST, J. K., MICHL, P., AHIMA, R. S., VAN BUEREN, A., MCCALL, A. L., AND FLIER, J. S. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 139, 8 (Aug 1998), 3485–91.
- [20] BORN, J., LANGE, T., KERN, W., MCGREGOR, G. P., BICKEL, U., AND FEHM, H. L. Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat Neurosci* 5, 6 (Jun 2002), 514–6.
- [21] BOURET, S. G. Crossing the border: developmental regulation of leptin transport to the brain. *Endocrinology* 149, 3 (Mar 2008), 875–6.
- [22] BROGLIO, F., ARVAT, E., BENSO, A., GOTTERO, C., MUCCIOLI, G., PAPOTTI, M., VAN DER LELY, A. J., DEGHEGHI, R., AND GHIGO, E. Ghrelin, a natural gh secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 10 (Oct 2001), 5083–6.
- [23] CALAPAI, G., CORICA, F., ALLEGRA, A., CORSONELLO, A., SAUTEBIN, L., DE GREGORIO, T., DI ROSA, M., COSTANTINO, G., BUEMI, M., AND CAPUTI, A. P. Effects of intracerebroventricular leptin administration on food intake, body weight gain and diencephalic nitric oxide synthase activity in the mouse. *Br J Pharmacol* 125, 4 (Oct 1998), 798–802.
- [24] CAO, G. Y., CONSIDINE, R. V., AND LYNN, R. B. Leptin receptors in the adrenal medulla of the rat. *Am J Physiol* 273, 2 Pt 1 (Aug 1997), E448–52.
- [25] CAREY, G. B. Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. *Adv Exp Med Biol* 441 (1998), 157–70.
- [26] CARO, J. F., KOLACZYNSKI, J. W., NYCE, M. R., OHANNESIAN, J. P., OPENTANOVA, I., GOLDMAN, W. H., LYNN, R. B., ZHANG, P. L., SINHA, M. K., AND CONSIDINE, R. V. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348, 9021 (Jul 1996), 159–61.
- [27] CASES, J. A., GABRIELY, I., MA, X. H., YANG, X. M., MICHAELI, T., FLEI-

- SCHER, N., ROSSETTI, L., AND BARZILAI, N. Physiological increase in plasma leptin markedly inhibits insulin secretion in vivo. *Diabetes* 50, 2 (Feb 2001), 348–52.
- [28] CASSONI, P., PAPOTTI, M., GHÈ, C., CATAPANO, F., SAPINO, A., GRAZIANI, A., DEGHENGI, R., REISSMANN, T., GHIGO, E., AND 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* 86, 4 (Apr 2001), 1738–45.
- [29] CHAPMAN, C. D., FREY, 2ND, W. H., CRAFT, S., DANIELYAN, L., HALLSCHMID, M., SCHIÖTH, H. B., AND BENEDICT, C. Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharm Res* 30, 10 (Oct 2013), 2475–84.
- [30] COLL, A. P., FAROOQI, I. S., AND O’RAHILLY, S. The hormonal control of food intake. *Cell* 129, 2 (Apr 2007), 251–62.
- [31] CONE, R. D. Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev* 27, 7 (Dec 2006), 736–49.
- [32] COPPARI, R., ICHINOSE, M., LEE, C. E., PULLEN, A. E., KENNY, C. D., MCGOVERN, R. A., TANG, V., LIU, S. M., LUDWIG, T., CHUA, JR, S. C., LOWELL, B. B., AND ELMQUIST, J. K. The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin’s effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab* 1, 1 (Jan 2005), 63–72.
- [33] COWLEY, M. A., SMITH, R. G., DIANO, S., TSCHÖP, M., PRONCHUK, N., GROVE, K. L., STRASBURGER, C. J., BIDLINGMAIER, M., ESTERMAN, M., HEIMAN, M. L., GARCIA-SEGURA, L. M., NILLNI, E. A., MENDEZ, P., LOW, M. J., SOTONYI, P., FRIEDMAN, J. M., LIU, H., PINTO, S., COLMERS, W. F., CONE, R. D., AND HORVATH, T. L. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the cns demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 4 (Feb 2003), 649–61.
- [34] CUMMINGS, D. E., PURNELL, J. Q., FRAYO, R. S., SCHMIDOVA, K., WISSE, B. E., AND WEIGLE, D. S. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 8 (Aug 2001), 1714–9.
- [35] CUNNINGHAM, M. J., CLIFTON, D. K., AND STEINER, R. A. Leptin’s actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 60, 2 (Feb 1999), 216–22.

- [36] DATE, Y., KOJIMA, M., HOSODA, H., SAWAGUCHI, A., MONDAL, M. S., SUGANUMA, T., MATSUKURA, S., KANGAWA, K., AND NAKAZATO, M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141, 11 (Nov 2000), 4255–61.
- [37] DATE, Y., MURAKAMI, N., TOSHINAI, K., MATSUKURA, S., NIJIMA, A., MATSUO, H., KANGAWA, K., AND NAKAZATO, M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123, 4 (Oct 2002), 1120–8.
- [38] DATE, Y., NAKAZATO, M., HASHIGUCHI, S., DEZAKI, K., MONDAL, M. S., HOSODA, H., KOJIMA, M., KANGAWA, K., ARIMA, T., MATSUO, H., YADA, T., AND MATSUKURA, S. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51, 1 (Jan 2002), 124–9.
- [39] DELIUS, W., HAGBARTH, K. E., HONGELL, A., AND WALLIN, B. G. Manoeuvres affecting sympathetic outflow in human muscle nerves. *Acta Physiol Scand* 84, 1 (Jan 1972), 82–94.
- [40] DOI, A., SHONO, T., NISHI, M., FURUTA, H., SASAKI, H., AND NANJO, K. Ia-2beta, but not ia-2, is induced by ghrelin and inhibits glucose-stimulated insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4 (Jan 2006), 885–90.
- [41] D’SOUZA, A. M., NEUMANN, U. H., GLAVAS, M. M., AND KIEFFER, T. J. The glucoregulatory actions of leptin. *Mol Metab* 6, 9 (09 2017), 1052–1065.
- [42] DUNBAR, J. C., HU, Y., AND LU, H. Intracerebroventricular leptin increases lumbar and renal sympathetic nerve activity and blood pressure in normal rats. *Diabetes* 46, 12 (Dec 1997), 2040–3.
- [43] FAGIUS, J., AND KARHUVAARA, S. Sympathetic activity and blood pressure increases with bladder distension in humans. *Hypertension* 14, 5 (Nov 1989), 511–517.
- [44] FANTUZZI, G., AND FAGGIONI, R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 68, 4 (Oct 2000), 437–46.
- [45] FAROOQI, I. S., DROP, S., CLEMENTS, A., KEOGH, J. M., BIERNACKA, J., LOWENBEIN, S., CHALLIS, B. G., AND O’RAHILLY, S. Heterozygosity for a pomc-null mutation and increased obesity risk in humans. *Diabetes* 55, 9 (Sep 2006), 2549–53.
- [46] FAROOQI, I. S., MATARESE, G., LORD, G. M., KEOGH, J. M., LAWRENCE,

- E., AGWU, C., SANNA, V., JEBB, S. A., PERNA, F., FONTANA, S., LECHLER, R. I., DEPAOLI, A. M., AND O'RAHILLY, S. Beneficial effects of leptin on obesity, t cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 110, 8 (Oct 2002), 1093–103.
- [47] FAUL, F., ERDFELDER, E., LANG, A.-G., AND BUCHNER, A. G*power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 39, 2 (May 2007), 175–91.
- [48] FETISSOV, S. O., LAVIANO, A., KALRA, S., AND INUI, A. Update on ghrelin. *Int J Pept* 2010 (2010).
- [49] FLIEDNER, S., SCHULZ, C., AND LEHNERT, H. Brain uptake of intranasally applied radioiodinated leptin in wistar rats. *Endocrinology* 147, 5 (May 2006), 2088–94.
- [50] FRIEDMAN, J. The long road to leptin. *J Clin Invest* 126, 12 (12 2016), 4727–4734.
- [51] FRIEDMAN, J. M. Obesity in the new millennium. *Nature* 404, 6778 (Apr 2000), 632–4.
- [52] FRÜHBECK, G., AGUADO, M., AND MARTÍNEZ, J. A. In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 3 (Nov 1997), 590–4.
- [53] FUJIKAWA, T., CHUANG, J.-C., SAKATA, I., RAMADORI, G., AND COPPARI, R. Leptin therapy improves insulin-deficient type 1 diabetes by cns-dependent mechanisms in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 40 (Oct 2010), 17391–6.
- [54] GAYTAN, F., BARREIRO, M. L., CHOPIN, L. K., HERINGTON, A. C., MORALES, C., PINILLA, L., CASANUEVA, F. F., AGUILAR, E., DIÉGUEZ, C., AND TENA-SEMPERE, M. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2 (Feb 2003), 879–87.
- [55] GIL-CAMPOS, M., CAÑETE, R., AND GIL, A. Hormones regulating lipid metabolism and plasma lipids in childhood obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 Suppl 3 (Nov 2004), S75–80.
- [56] GOLDSTEIN, D. S., AND KOPIN, I. J. Evolution of concepts of stress. *Stress* 10, 2 (Jun 2007), 109–20.
- [57] GÖRTZEN, A., AND VEH, R. W. Adipositas - eine einföhrung in molekulare mechanismen. *Deutsches Ärzteblatt International* 104, 36 (2007), 1166–1172.

- [58] GUAN, X. M., YU, H., PALYHA, O. C., MCKEE, K. K., FEIGHNER, S. D., SIRINATHSINGHI, D. J., SMITH, R. G., VAN DER PLOEG, L. H., AND HOWARD, A. D. Distribution of mrna encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 48, 1 (Aug 1997), 23–9.
- [59] HÅKANSSON, M. L., BROWN, H., GHILARDI, N., SKODA, R. C., AND MEISTER, B. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci* 18, 1 (Jan 1998), 559–72.
- [60] HANSEN, T. K., DALL, R., HOSODA, H., KOJIMA, M., KANGAWA, K., CHRISTIANSEN, J. S., AND JØRGENSEN, J. O. L. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 56, 2 (Feb 2002), 203–6.
- [61] HAQUE, M. S., MINOKOSHI, Y., HAMAI, M., IWAI, M., HORIUCHI, M., AND SHIMAZU, T. Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes* 48, 9 (Sep 1999), 1706–12.
- [62] HASLAM, D. W., AND JAMES, W. P. T. Obesity. *Lancet* 366, 9492 (Oct 2005), 1197–209.
- [63] HAYNES, W. G., MORGAN, D. A., WALSH, S. A., MARK, A. L., AND SIVITZ, W. I. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest* 100, 2 (Jul 1997), 270–8.
- [64] HERRMANN, J., AND STAIB, W. [relationships among lipolysis, gluconeogenesis and insulin secretion after administration of cortisol to rats]. *Eur J Biochem* 7, 3 (Jan 1969), 427–33.
- [65] HEWSON, A. K., AND DICKSON, S. L. Systemic administration of ghrelin induces fos and egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* 12, 11 (Nov 2000), 1047–9.
- [66] HEYMSFIELD, S. B., GREENBERG, A. S., FUJIOKA, K., DIXON, R. M., KUSHNER, R., HUNT, T., LUBINA, J. A., PATANE, J., SELF, B., HUNT, P., AND MCCAMISH, M. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* 282, 16 (Oct 1999), 1568–75.
- [67] HOSODA, H., KOJIMA, M., MIZUSHIMA, T., SHIMIZU, S., AND KANGAWA, K. Structural divergence of human ghrelin. identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem* 278, 1 (Jan 2003), 64–70.

- [68] HOTTA, M., OHWADA, R., AKAMIZU, T., SHIBASAKI, T., TAKANO, K., AND KANGAWA, K. Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa: a pilot study. *Endocr J* 56, 9 (2009), 1119–28.
- [69] HOUSEKNECHT, K. L., MANTZOROS, C. S., KULIAWAT, R., HADRO, E., FLIER, J. S., AND KAHN, B. B. Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes* 45, 11 (Nov 1996), 1638–43.
- [70] HOWARD, A. D., FEIGHNER, S. D., CULLY, D. F., ARENA, J. P., LIBERATOR, P. A., ROSENBLUM, C. I., HAMELIN, M., HRENIUK, D. L., PALYHA, O. C., ANDERSON, J., PARESS, P. S., DIAZ, C., CHOU, M., LIU, K. K., MCKEE, K. K., PONG, S. S., CHAUNG, L. Y., ELBRECHT, A., DASHKEVICZ, M., HEAVENS, R., RIGBY, M., SIRINATHSINGHJI, D. J., DEAN, D. C., MELILLO, D. G., PATCHETT, A. A., NARGUND, R., GRIFFIN, P. R., DEMARTINO, J. A., GUPTA, S. K., SCHAEFFER, J. M., SMITH, R. G., AND VAN DER PLOEG, L. H. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273, 5277 (Aug 1996), 974–7.
- [71] HWA, J. J., FAWZI, A. B., GRAZIANO, M. P., GHIBAUDI, L., WILLIAMS, P., VAN HECK, M., DAVIS, H., RUDINSKI, M., SYBERTZ, E., AND STRADER, C. D. Leptin increases energy expenditure and selectively promotes fat metabolism in ob/ob mice. *Am J Physiol* 272, 4 Pt 2 (Apr 1997), R1204–9.
- [72] INGALLS, A. M., DICKIE, M. M., AND SNELL, G. D. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered* 41, 12 (Dec 1950), 317–8.
- [73] IWEN, K. A., SCHERER, T., HENI, M., SAYK, F., WELLNITZ, T., MACHLEIDT, F., PREISSL, H., HÄRING, H.-U., FRITSCHKE, A., LEHNERT, H., BUETTNER, C., AND HALLSCHMID, M. Intranasal insulin suppresses systemic but not subcutaneous lipolysis in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 99, 2 (Feb 2014), E246–51.
- [74] KAMEGAI, J., TAMURA, H., SHIMIZU, T., ISHII, S., SUGIHARA, H., AND WAKABAYASHI, I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide y and agouti-related protein mrna levels and body weight in rats. *Diabetes* 50, 11 (Nov 2001), 2438–43.
- [75] KANT, P., AND HULL, M. A. Excess body weight and obesity—the link with gastrointestinal and hepatobiliary cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8, 4 (Apr 2011), 224–38.
- [76] KELESIDIS, T., KELESIDIS, I., CHOU, S., AND MANTZOROS, C. S. Narrative

- review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Ann Intern Med* 152, 2 (Jan 2010), 93–100.
- [77] KIEFFER, T. J., HELLER, R. S., AND HABENER, J. F. Leptin receptors expressed on pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 224, 2 (Jul 1996), 522–7.
- [78] KIEFFER, T. J., HELLER, R. S., LEECH, C. A., HOLZ, G. G., AND HABENER, J. F. Leptin suppression of insulin secretion by the activation of atp-sensitive k⁺ channels in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 46, 6 (Jun 1997), 1087–93.
- [79] KLEIN, S., COPPACK, S. W., MOHAMED-ALI, V., AND LANDT, M. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* 45, 7 (Jul 1996), 984–7.
- [80] KLOK, M. D., JAKOBSDOTTIR, S., AND DRENT, M. L. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev* 8, 1 (Jan 2007), 21–34.
- [81] KOCH, C., AUGUSTINE, R. A., STEGER, J., GANJAM, G. K., BENZLER, J., PRACHT, C., LOWE, C., SCHWARTZ, M. W., SHEPHERD, P. R., ANDERSON, G. M., GRATTAN, D. R., AND TUPS, A. Leptin rapidly improves glucose homeostasis in obese mice by increasing hypothalamic insulin sensitivity. *J Neurosci* 30, 48 (Dec 2010), 16180–7.
- [82] KOJIMA, M., HOSODA, H., DATE, Y., NAKAZATO, M., MATSUO, H., AND KANGAWA, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 6762 (Dec 1999), 656–60.
- [83] KOJIMA, M., AND KANGAWA, K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 85, 2 (Apr 2005), 495–522.
- [84] KOLACZYNSKI, J. W., NYCE, M. R., CONSIDINE, R. V., BODEN, G., NOLAN, J. J., HENRY, R., MUDALIAR, S. R., OLEFSKY, J., AND CARO, J. F. Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. *Diabetes* 45, 5 (May 1996), 699–701.
- [85] KOPELMAN, P. Health risks associated with overweight and obesity. *Obes Rev* 8 Suppl 1 (Mar 2007), 13–7.
- [86] KOPELMAN, P. Symposium 1: Overnutrition: consequences and solutions. foresight report: the obesity challenge ahead. *Proc Nutr Soc* 69, 1 (Feb 2010), 80–5.
- [87] KORBONITS, M., KOJIMA, M., KANGAWA, K., AND GROSSMAN, A. B. Pre-

- sence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine* 14, 1 (Feb 2001), 101–4.
- [88] KRAPALIS, A. F., REITER, J., MACHLEIDT, F., IWEN, K. A., DODT, C., LEHNERT, H., AND SAYK, F. Ghrelin modulates baroreflex-regulation of sympathetic vasomotor tone in healthy humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302, 11 (Jun 2012), R1305–12.
- [89] LAFONTAN, M., AND BERLAN, M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res* 34, 7 (Jul 1993), 1057–91.
- [90] LÓPEZ, M., LAGE, R., SAHA, A. K., PÉREZ-TILVE, D., VÁZQUEZ, M. J., VARELA, L., SANGIAO-ALVARELLOS, S., TOVAR, S., RAGHAY, K., RODRÍGUEZ-CUENCA, S., DEOLIVEIRA, R. M., CASTAÑEDA, T., DATTA, R., DONG, J. Z., CULLER, M., SLEEMAN, M. W., ALVAREZ, C. V., GALLEGO, R., LELLIOTT, C. J., CARLING, D., TSCHÖP, M. H., DIÉGUEZ, C., AND VIDAL-PUIG, A. Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab* 7, 5 (May 2008), 389–99.
- [91] LUCIDI, P., MURDOLO, G., DI LORETO, C., PARLANTI, N., DE CICCO, A., FATONE, C., TAGLIONI, C., FANELLI, C., BROGLIO, F., GHIGO, E., BOLLI, G. B., SANTEUSANIO, F., AND DE FEO, P. Metabolic and endocrine effects of physiological increments in plasma ghrelin concentrations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15, 6 (Dec 2005), 410–7.
- [92] LUTTER, M., SAKATA, I., OSBORNE-LAWRENCE, S., ROVINSKY, S. A., ANDERSON, J. G., JUNG, S., BIRNBAUM, S., YANAGISAWA, M., ELMQUIST, J. K., NESTLER, E. J., AND ZIGMAN, J. M. The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nat Neurosci* 11, 7 (Jul 2008), 752–3.
- [93] MACHLEIDT, F. *Akute Effekte von Leptin auf die sympathische Nervenaktivität und kardiovaskuläre Parameter beim Menschen*. PhD thesis, Medizinischen Klinik I. Universität zu Lübeck, 2014.
- [94] MACHLEIDT, F., SIMON, P., KRAPALIS, A. F., HALLSCHMID, M., LEHNERT, H., AND SAYK, F. Experimental hyperleptinemia acutely increases vasoconstrictory sympathetic nerve activity in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 98, 3 (Mar 2013), E491–6.
- [95] MAFFEI, M., HALAAS, J., RAVUSSIN, E., PRATLEY, R. E., LEE, G. H., ZHANG, Y., FEI, H., KIM, S., LALLONE, R., AND RANGANATHAN, S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob rna in

- obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1, 11 (Nov 1995), 1155–61.
- [96] MASUZAKI, H., HOSODA, K., OGAWA, Y., SHIGEMOTO, M., SATOH, N., MORI, K., TAMURA, N., NISHI, S., YOSHIMASA, Y., YAMORI, Y., AND NAKAO, K. Augmented expression of obese (ob) gene during the process of obesity in genetically obese-hyperglycemic wistar fatty (fa/fa) rats. *FEBS Lett* 378, 3 (Jan 1996), 267–71.
- [97] MATTHEWS, D. R., HOSKER, J. P., RUDENSKI, A. S., NAYLOR, B. A., TREACHER, D. F., AND TURNER, R. C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 7 (Jul 1985), 412–9.
- [98] MCKEE, K. K., PALYHA, O. C., FEIGHNER, S. D., HRENIUK, D. L., TAN, C. P., PHILLIPS, M. S., SMITH, R. G., VAN DER PLOEG, L. H., AND HOWARD, A. D. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol* 11, 4 (Apr 1997), 415–23.
- [99] MEIER, U., AND GRESSNER, A. M. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 50, 9 (Sep 2004), 1511–25.
- [100] MIEGUEU, P., ST PIERRE, D., BROGLIO, F., AND CIANFLONE, K. Effect of desacyl ghrelin, obestatin and related peptides on triglyceride storage, metabolism and ghsr signaling in 3t3-l1 adipocytes. *J Cell Biochem* 112, 2 (Feb 2011), 704–14.
- [101] MINOKOSHI, Y., HAQUE, M. S., AND SHIMAZU, T. Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. *Diabetes* 48, 2 (Feb 1999), 287–91.
- [102] MINOKOSHI, Y., KIM, Y.-B., PERONI, O. D., FRYER, L. G. D., MÜLLER, C., CARLING, D., AND KAHN, B. B. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating amp-activated protein kinase. *Nature* 415, 6869 (Jan 2002), 339–43.
- [103] MINOKOSHI, Y., TODA, C., AND OKAMOTO, S. Regulatory role of leptin in glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Indian J Endocrinol Metab* 16, Suppl 3 (Dec 2012), S562–8.
- [104] MOON, H.-S., DALAMAGA, M., KIM, S.-Y., POLYZOS, S. A., HAMNVIK, O.-P., MAGKOS, F., PARUTHI, J., AND MANTZOROS, C. S. Leptin’s role in lipodystrophic and nonlipodystrophic insulin-resistant and diabetic individuals. *Endocr Rev* 34, 3 (Jun 2013), 377–412.

- [105] MORI, K., YOSHIMOTO, A., TAKAYA, K., HOSODA, K., ARIYASU, H., YAHATA, K., MUKOYAMA, M., SUGAWARA, A., HOSODA, H., KOJIMA, M., KANGAWA, K., AND NAKAO, K. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett* 486, 3 (Dec 2000), 213–6.
- [106] MUCCIOLI, G., BARAGLI, A., GRANATA, R., PAPOTTI, M., AND GHIGO, E. Heterogeneity of ghrelin/growth hormone secretagogue receptors. toward the understanding of the molecular identity of novel ghrelin/ghs receptors. *Neuroendocrinology* 86, 3 (2007), 147–64.
- [107] MUCCIOLI, G., PONS, N., GHÈ, C., CATAPANO, F., GRANATA, R., AND 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* 498, 1-3 (Sep 2004), 27–35.
- [108] MULLER, A. F., JANSSEN, J. A., HOFLAND, L. J., LAMBERTS, S. W., BIDLINGMAIER, M., STRASBURGER, C. J., AND VAN DER LELY, A. J. Blockade of the growth hormone (gh) receptor unmasks rapid gh-releasing peptide-6-mediated tissue-specific insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2 (Feb 2001), 590–3.
- [109] MUZUMDAR, R., MA, X., YANG, X., ATZMON, G., BERNSTEIN, J., KARKANIAS, G., AND BARZILAI, N. Physiologic effect of leptin on insulin secretion is mediated mainly through central mechanisms. *FASEB J* 17, 9 (Jun 2003), 1130–2.
- [110] NAGAYA, N., KOJIMA, M., UEMATSU, M., YAMAGISHI, M., HOSODA, H., OYA, H., HAYASHI, Y., AND KANGAWA, K. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. R1483–7.
- [111] NAKAGAWA, E., NAGAYA, N., OKUMURA, H., ENOMOTO, M., OYA, H., ONO, F., HOSODA, H., KOJIMA, M., AND KANGAWA, K. Hyperglycaemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth-hormone-releasing peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose. *Clin Sci (Lond)* 103, 3 (Sep 2002), 325–8.
- [112] NAKAZATO, M., MURAKAMI, N., DATE, Y., KOJIMA, M., MATSUO, H., KANGAWA, K., AND MATSUKURA, S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409, 6817 (Jan 2001), 194–8.
- [113] NIEMINEN, P., AND MUSTONEN, A.-M. Effects of peripheral ghrelin on the carbohydrate and lipid metabolism of the tundra vole (*Microtus oeconomus*). *Gen Comp Endocrinol* 138, 2 (Sep 2004), 182–7.

- [114] OSWAL, A., AND YEO, G. Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. *Obesity (Silver Spring)* 18, 2 (Feb 2010), 221–9.
- [115] PARK, S., AHN, I. S., AND KIM, D. S. Central infusion of leptin improves insulin resistance and suppresses beta-cell function, but not beta-cell mass, primarily through the sympathetic nervous system in a type 2 diabetic rat model. *Life Sci* 86, 23-24 (Jun 2010), 854–62.
- [116] PAZ-FILHO, G., MASTRONARDI, C., DELIBASI, T., WONG, M.-L., AND LICINIO, J. Congenital leptin deficiency: diagnosis and effects of leptin replacement therapy. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 54, 8 (Nov 2010), 690–7.
- [117] PELLEYMOUNTER, M. A., CULLEN, M. J., BAKER, M. B., HECHT, R., WINTERS, D., BOONE, T., AND COLLINS, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269, 5223 (Jul 1995), 540–3.
- [118] PRADO, C. L., PUGH-BERNARD, A. E., ELGHAZI, L., SOSA-PINEDA, B., AND SUSSEL, L. Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9 (Mar 2004), 2924–9.
- [119] PRIEUR, X., TUNG, Y. C. L., GRIFFIN, J. L., FAROOQI, I. S., O’RAHILLY, S., AND COLL, A. P. Leptin regulates peripheral lipid metabolism primarily through central effects on food intake. *Endocrinology* 149, 11 (Nov 2008), 5432–9.
- [120] PRIGGE, W. F., AND GRANDE, F. Effects of glucagon, epinephrine and insulin on in vitro lipolysis of adipose tissue from mammals and birds. *Comp Biochem Physiol B* 39, 1 (May 1971), 69–82.
- [121] RIGAMONTI, A. E., PINCELLI, A. I., CORRÀ, B., VIARENGO, R., BONOMO, S. M., GALIMBERTI, D., SCACCHI, M., SCARPINI, E., CAVAGNINI, F., AND MÜLLER, E. E. Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *J Endocrinol* 175, 1 (Oct 2002), R1–5.
- [122] RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. i. effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 239 (Feb 1964), 375–80.
- [123] RODRÍGUEZ, A. Novel molecular aspects of ghrelin and leptin in the control of adipobiology and the cardiovascular system. *Obes Facts* 7, 2 (2014), 82–95.
- [124] ROSSETTI, L., MASSILLON, D., BARZILAI, N., VUGUIN, P., CHEN, W., HAWKINS, M., WU, J., AND WANG, J. Short term effects of leptin on hepatic gluconeogenesis and in vivo insulin action. *J Biol Chem* 272, 44 (Oct 1997), 27758–63.

- [125] RÜTER, J., KOBELT, P., TEBBE, J. J., AVSAR, Y., VEH, R., WANG, L., KLAPP, B. F., WIEDENMANN, B., TACHÉ, Y., AND MÖNNIKES, H. Intraperitoneal injection of ghrelin induces fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *Brain Res* 991, 1-2 (Nov 2003), 26–33.
- [126] SALADIN, R., DE VOS, P., GUERRE-MILLO, M., LETURQUE, A., GIRARD, J., STAELS, B., AND AUWERX, J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377, 6549 (Oct 1995), 527–9.
- [127] SANGIAO-ALVARELLOS, S., AND CORDIDO, F. Effect of ghrelin on glucose-insulin homeostasis: therapeutic implications. *Int J Pept* 2010 (2010).
- [128] SARMIENTO, U., BENSON, B., KAUFMAN, S., ROSS, L., QI, M., SCULLY, S., AND DIPALMA, C. Morphologic and molecular changes induced by recombinant human leptin in the white and brown adipose tissues of c57bl/6 mice. *Lab Invest* 77, 3 (Sep 1997), 243–56.
- [129] SATOU, M., NISHI, Y., YOH, J., HATTORI, Y., AND SUGIMOTO, H. Identification and characterization of acyl-protein thioesterase 1/lysophospholipase i as a ghrelin deacylation/lysophospholipid hydrolyzing enzyme in fetal bovine serum and conditioned medium. *Endocrinology* 151, 10 (Oct 2010), 4765–75.
- [130] SCHULZ, C., PAULUS, K., JÖHREN, O., AND LEHNERT, H. Intranasal leptin reduces appetite and induces weight loss in rats with diet-induced obesity (dio). *Endocrinology* 153, 1 (Jan 2012), 143–53.
- [131] SCHULZ, C., PAULUS, K., AND LEHNERT, H. Central nervous and metabolic effects of intranasally applied leptin. *Endocrinology* 145, 6 (Jun 2004), 2696–701.
- [132] SCHWARTZ, M. W., BASKIN, D. G., BUKOWSKI, T. R., KUIJPER, J. L., FOSTER, D., LASSER, G., PRUNKARD, D. E., PORTE, JR, D., WOODS, S. C., SEELEY, R. J., AND WEIGLE, D. S. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 45, 4 (Apr 1996), 531–5.
- [133] SEUFERT, J., KIEFFER, T. J., AND HABENER, J. F. Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2 (Jan 1999), 674–9.
- [134] SHIMABUKURO, M., KOYAMA, K., CHEN, G., WANG, M. Y., TRIEU, F., LEE, Y., NEWGARD, C. B., AND UNGER, R. H. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9 (Apr 1997), 4637–41.

- [135] SHINTANI, M., OGAWA, Y., EBIHARA, K., AIZAWA-ABE, M., MIYANAGA, F., TAKAYA, K., HAYASHI, T., INOUE, G., HOSODA, K., KOJIMA, M., KANGAWA, K., AND NAKAO, K. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide y/y1 receptor pathway. *Diabetes* 50, 2 (Feb 2001), 227–32.
- [136] STEINBERG, G. R., BONEN, A., AND DYCK, D. J. Fatty acid oxidation and triacylglycerol hydrolysis are enhanced after chronic leptin treatment in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, 3 (Mar 2002), E593–600.
- [137] TAKAYA, K., ARIYASU, H., KANAMOTO, N., IWAKURA, H., YOSHIMOTO, A., HARADA, M., MORI, K., KOMATSU, Y., USUI, T., SHIMATSU, A., OGAWA, Y., HOSODA, K., AKAMIZU, T., KOJIMA, M., KANGAWA, K., AND NAKAO, K. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 12 (Dec 2000), 4908–11.
- [138] TAKEDA, S., ELEFTERIOU, F., LEVASSEUR, R., LIU, X., ZHAO, L., PARKER, K. L., ARMSTRONG, D., DUCY, P., AND KARSENTY, G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111, 3 (Nov 2002), 305–17.
- [139] TARTAGLIA, L. A., DEMBSKI, M., WENG, X., DENG, N., CULPEPPER, J., DEVOS, R., RICHARDS, G. J., CAMPFIELD, L. A., CLARK, F. T., DEEDS, J., MUIR, C., SANKER, S., MORIARTY, A., MOORE, K. J., SMUTKO, J. S., MAYS, G. G., WOOL, E. A., MONROE, C. A., AND TEPPER, R. I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, ob-r. *Cell* 83, 7 (Dec 1995), 1263–71.
- [140] THEANDER-CARRILLO, C., WIEDMER, P., CETTOUR-ROSE, P., NOGUEIRAS, R., PEREZ-TILVE, D., PFLUGER, P., CASTANEDA, T. R., MUZZIN, P., SCHÜR-MANN, A., SZANTO, I., TSCHÖP, M. H., AND ROHNER-JEANRENAUD, F. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest* 116, 7 (Jul 2006), 1983–93.
- [141] TORTORELLA, C., MACCHI, C., SPINAZZI, R., MALENDOWICZ, L. K., TREJTER, M., AND NUSSDORFER, G. G. Ghrelin, an endogenous ligand for the growth hormone-secretagogue receptor, is expressed in the human adrenal cortex. *Int J Mol Med* 12, 2 (Aug 2003), 213–7.
- [142] VAN GAAL, L. F., WAUTERS, M. A., MERTENS, I. L., CONSIDINE, R. V., AND DE LEEUW, I. H. Clinical endocrinology of human leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 1 (Feb 1999), 29–36.
- [143] VERHULST, P.-J., AND DEPOORTERE, I. Ghrelin's second life: from appetite

- stimulator to glucose regulator. *World J Gastroenterol* 18, 25 (Jul 2012), 3183–95.
- [144] VESTERGAARD, E. T., BUHL, M., GJEDSTED, J., MADSEN, M., JESSEN, N., NIELSEN, S., GAYLINN, B. D., LIU, J., THORNER, M. O., MOLLER, N., AND JORGENSEN, J. O. L. Acute peripheral metabolic effects of intraarterial ghrelin infusion in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 96, 2 (Feb 2011), 468–77.
- [145] VESTERGAARD, E. T., DJURHUUS, C. B., GJEDSTED, J., NIELSEN, S., MØLLER, N., HOLST, J. J., JØRGENSEN, J. O. L., AND SCHMITZ, O. Acute effects of ghrelin administration on glucose and lipid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 2 (Feb 2008), 438–44.
- [146] VESTERGAARD, E. T., HANSEN, T. K., GORMSEN, L. C., JAKOBSEN, P., MOLLER, N., CHRISTIANSEN, J. S., AND JORGENSEN, J. O. L. Constant intravenous ghrelin infusion in healthy young men: clinical pharmacokinetics and metabolic effects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, 6 (Jun 2007), E1829–36.
- [147] VOLANTE, M., ALLIA, E., GUGLIOTTA, P., FUNARO, A., BROGLIO, F., DEGHENGI, R., MUCCIOLI, G., GHIGO, E., AND PAPOTTI, M. Expression of ghrelin and of the gh secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3 (Mar 2002), 1300–8.
- [148] WANG, M.-Y., CHEN, L., CLARK, G. O., LEE, Y., STEVENS, R. D., ILKAYEVA, O. R., WENNER, B. R., BAIN, J. R., CHARRON, M. J., NEWGARD, C. B., AND UNGER, R. H. Leptin therapy in insulin-deficient type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11 (Mar 2010), 4813–9.
- [149] WESTERTERP-PLANTENGA, M. S., SARIS, W. H., HUKSHORN, C. J., AND CAMPFIELD, L. A. Effects of weekly administration of pegylated recombinant human ob protein on appetite profile and energy metabolism in obese men. *Am J Clin Nutr* 74, 4 (Oct 2001), 426–34.
- [150] WINDER, W. W., AND HARDIE, D. G. Amp-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* 277, 1 Pt 1 (Jul 1999), E1–10.
- [151] WOLSK, E., MYGIND, H., GRØNDAHL, T. S., PEDERSEN, B. K., AND VAN HALL, G. The role of leptin in human lipid and glucose metabolism: the effects of acute recombinant human leptin infusion in young healthy males. *Am J Clin Nutr* 94, 6 (Dec 2011), 1533–44.
- [152] WOODS, S. C., SEELEY, R. J., PORTE, JR, D., AND SCHWARTZ, M. W. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280, 5368 (May 1998), 1378–83.

- [153] YANG, J., BROWN, M. S., LIANG, G., GRISHIN, N. V., AND GOLDSTEIN, J. L. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132, 3 (Feb 2008), 387–96.
- [154] YI, X., YUAN, D., FARR, S. A., BANKS, W. A., POON, C.-D., AND KABANOV, A. V. Pluronic modified leptin with increased systemic circulation, brain uptake and efficacy for treatment of obesity. *J Control Release* 191 (Oct 2014), 34–46.
- [155] YOUNGSTROM, T. G., AND BARTNESS, T. J. Catecholaminergic innervation of white adipose tissue in siberian hamsters. *Am J Physiol* 268, 3 Pt 2 (Mar 1995), R744–51.
- [156] ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L., AND FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 6505 (Dec 1994), 425–32.
- [157] ZHANG, Y., YU, H., GAO, P., CHEN, J., YU, C., ZONG, C., LU, S., LI, X., MA, X., LIU, Y., AND WANG, X. The effect of growth hormone on lipid accumulation or maturation in adipocytes. *Cell Physiol Biochem* 39, 6 (2016), 2135–2148.

7 Anhang

7.1 Materialien und Substanzen

Tab. 7.1: Substanzen

Substanz	Herstellerdaten
Nitroprussidnatrium, Nipruss®	Schwarz Pharma GmbH, Monheim, Deutschland
Phenylephrin	Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, USA
Rekombinantes huma- nes Leptin	Globe Laboratories, Canada
Ghrelin(human) trifluoroacetate salt	Bachem, Schweiz
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Natriumchloridlösung 0,9 %-ige	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Glucoselösung 5 %-ige	Delta-Pharma GmbH, Pfullingen, Deutschland
Ringerlösung	Delta-Pharma GmbH, Pfullingen, Deutschland
Cutasept® F	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland

Tab. 7.2: Laborkits und Assays

Substanz	Laborkits/Assay	Hersteller	Typ
Leptin	Human Leptin RIA Kit	Millipore Corporation	Radioimmunassay
Ghrelin	Total Ghrelin RIA Kit	Millipore Corporation	Radioimmunassay
ACTH	ACTH Immulite® 1000	Siemens	Chemilumineszenz-, Immunometrischer Assay
Cortisol	Cortisol Immulite® 1000	Siemens	kompetitiver Festphasen Chemilumineszenz-, Immunoassay
Insulin	Insulin Immulite® 1000	Siemens	Festphasen-, enzymmarkierter Chemilumineszenz-, Immunoassay
GH	GH Immulite® 1000	Siemens	Chemilumineszenzassay

Tab. 7.3: Materialien

Material	Herstellerdaten
i.v. Katheter, OPTI-VA® 16 G x 2"	Johnson & Johnson, New Brunswick, USA
Fixationpflaster, Curapor® i.v.	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf, Deutschland
Mullkompressen 14G	Fuhrmann GmbH, Much, Deutschland
Braunüle 20G	Vasofix® Firma Braun, Melsungen, Deutschland
Monovetten	Fa. Sarsted, Nümbrecht, Deutschland
Reaktiongefäß 1,5 ml	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spritzen 2, 5, 10 ml, BD Discardit™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
EKG-Einmal-Elektroden ARBO®	Tyco Healthcare Deutschland GmbH, Neustadt (Donau), Deutschland
Mikroneurographie Elektroden	Göran Pegenius, Mölndal, Schweden

7.2 Ethikvotum

Die Studie wurde im Vorfeld unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten von der Ethik-Kommission geprüft und bewilligt (Aktenzeichen: 09-166; Datum: 19. November 2009).

8 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Friedhelm Sayk, meinem Doktorvater und Betreuer. Er hat die Studie ins Leben gerufen, konzipiert und geleitet. Durch sein stets offenes Ohr, seine akribische, ruhige und sachliche Art, gepaart mit einem fundierten Hintergrundwissen, habe ich ihn als Wissenschaftlicher und auch als Privatperson überaus zu schätzen gelernt.

Ebenfalls ganz herzlich danken möchte ich Herrn Dr. Felix Machleidt, meinem Zweitbetreuer und Mitdoktoranden. Er hat mich durch alle Bereiche der wissenschaftlichen Arbeit geführt und mir das Anfertigen meiner Promotion erst ermöglicht.

Darüber hinaus gebührt Herrn Dr. Alexander Krapalis mein Dank für seine fachliche und statistische Unterstützung bei den Versuchen und das Bereitstellen der metabolischen Daten aus der Ghrelinstudie.

Daniel Podzun und Marten Hamann haben mich mit wertvollen, technischen Ratschlägen versorgt. Mit ihrer Hilfe konnte ich einige Hürden in Bezug auf das Softwarepaket LaTeX überwinden. Vielen Dank dafür.

Mein tiefer Dank gilt meiner Frau Annika Sünderhauf. Als Motivatorin konnte sie mir fortwährend Anreize geben, meine Arbeit zu finalisieren. Als liebevolle Mutter unserer Tochter Anuk hat sie mir Freiräume geschaffen, damit ich mich immer wieder an den Schreibtisch setzen konnte. Als wissenschaftliche Mitarbeiterin stand sie mir stets beratend, insbesondere bei statistischen Belangen, zur Seite.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Elke und Uwe Simon sowie meinem Bruder Peter Simon, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg begleitet und in vielen Lebenslagen unterstützt haben.

9 Lebenslauf



Persönliche Daten

Name	Paul Simon
Geburtsdatum	14.04.1987
Geburtsort	Wolmirstedt
Familienstand	verheiratet, eine Tochter (* Januar 2019)
Nationalität	deutsch
Geschlecht	männlich

Beruflicher Werdegang

ab 09/2020	Facharzt für Radiologie, UKSH Campus Lübeck
02/2018-09/2020	Assistenzarzt für Radiologie, UKSH Campus Lübeck
02/2015-01/2018	Assistenzarzt für Radiologie, Helios Kliniken Schwerin

Ausbildung

05/2014	Approbation Medizin, UKSH Campus Lübeck
10/2007-05/2014	Studium der Humanmedizin, UKSH Campus Lübeck
10/2013-01/2014	PJ-Tertial III: Allgemeinmedizin, Lübeck
06/2013-10/2013	PJ-Tertial II: Innere Medizin, Ratzeburg
02/2013-06/2013	PJ-Tertial I: Chirurgie, Bergen (Norwegen)

08/2011-12/2011 Auslandssemester, Universität Bergen, Norwegen
2006/2007 Zivildienst im Klinikum Bernburg
2006 Abitur, Gymnasium Carolinum, Bernburg

Veröffentlichungen und Fallberichte

Publikation Machleidt F, Simon P, Krapalis AF, Hallschmid M, Lehnert H, Sayk F. Experimental hyperleptinemia acutely increases vasoconstrictory sympathetic nerve activity in healthy humans. J Clin Endocrinol Metab. 2013 Mar;98(3):E491-6.

Fallbericht Zufallsbefund nach Infekt: Pulmonale Manifestation einer seltenen Autoimmunerkrankung bei einem Kleinkind, Deutscher Röntgenkongress 2020

Fallbericht Déjà-vu: Fehldiagnose Hämatothorax nach Sturz vom Pferd. Deutscher Röntgenkongress 2019

Interessen Lauf- und Ballsport, Reisen, Musik, Natur

7. August 2021

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Paul Martin Simon, dass die Dissertation von mir selbstständig angefertigt wurde und alle von mir genutzten Hilfsmittel angegeben wurden.

Ich erkläre, dass die wörtlichen oder dem Sinne nach anderen Veröffentlichungen entnommenen Stellen von mir kenntlich gemacht wurden.

Ort:

Datum:

Unterschrift: