

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. Christian Hagl

**Die Modulation von Ghrelin, einem kardiovaskulären Hormon und des Ghrelin-
Rezeptors in Myokard chronisch herzinsuffizienter Patienten.**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Thomas Pöttinger
aus München

2012

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Andres Beiras Fernandez
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Siess Priv. Doz. Dr. Heidi L. Estner Prof. Dr. Dr. h.c. Heinrich Netz
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	28.06.2012

Für meinen Großvater Fritz.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Herzinsuffizienz	1
1.1.1. Definition	1
1.1.2. Epidemiologie.....	1
1.1.3. Klassifikation	1
1.1.4. Ätiologie.....	2
1.1.5. Pathophysiologie.....	3
1.1.5.1 Kardiale Veränderungen bei Herzinsuffizienz (HI).....	3
1.1.5.2. Funktionelle Veränderungen des insuffizienten Herzens.....	4
1.2. Definition	9
1.3. Geschichte	9
1.4. Bedeutung für das kardiovaskuläre System	13
1.4.1. Vasodilatation.....	14
1.4.2. Kardioprotektive und antiischämische Effekte	14
1.4.3. Experimentelle Versuche bei pulmonaler Hypertonie	14
1.4.4. Experimentelle Studien bei Herzinsuffizienz.....	15
1.4.5. Klinische Möglichkeiten für Ghrelin und GHS bei Herzinsuffizienz.....	15
1.5. Physiologische Funktionen von Ghrelin	16
1.5.1. Aktivierung der GH-Freisetzung.....	16
1.5.2. Regulation des Essverhaltens, des Appetits und des Körpergewichts.....	17
1.5.3. Immunmodulation.....	18
1.5.4. Zellproliferation.....	18
1.5.5. Stoffwechsel	19
1.5.5.1. Glukosestoffwechsel	19
1.5.5.2. Lipidstoffwechsel	19
1.5.5.3. Gastrointestinale Funktionen	20
1.5.5.4. Steigerung der Herzleistung.....	20
1.6. Lokalisation	21
1.7. Beziehung Ghrelin – Herz	21
1.7.1. in vitro - Studien zur Ghrelinexpression von Kardiomyozyten und dem Ghrelinrezeptor	21
1.7.2. Der mögliche Einfluss von Ghrelin auf die Progredienz chronischer Herzinsuffizienz .	22
1.7.3. Kachexie.....	23
2. FRAGESTELLUNG DER STUDIE	25
3. MATERIAL UND METHODEN	26
3.1. Demographie Studiengruppe/Patienten	26
3.2. Demographie der Kontrollgruppe	27

3.2.1. Autopsien	27
3.2.2. Kommerziell erworbene Myokard-RNA der Kontrollgruppe	28
3.3. Gewebeprobe	28
3.3.1. Beschreibung der Entnahme des insuffizienten Gewebes	28
3.3.2. Ghrelin-mRNA-Amplifikation mit RT-PCR.....	29
3.3.3. Der immunhistochemische Nachweis der Ghrelin-Expression	31
3.3.4. RNA-Extraktion und reverse Transkriptase	33
3.3.5. RT-PCR.....	33
3.4. Techniken	34
3.4.1. Immunhistochemie	34
3.4.1.1. Theorie der Immunhistochemie.....	34
3.4.1.2. Immunhistochemische Färbungen	34
3.4.2. Grundlagen der RT-PCR.....	35
3.4.2.1. Theorie der RT-PCR	35
3.5. Statistische Analysen	38
3.6. Veränderung der Ejektionsfraktion bei insuffizientem Herzen	38
4. ERGEBNISSE	40
4.1. Immunhistochemische Untersuchung – Kontrollgruppe	40
4.1.1. Darstellung der Verteilung des Ghrelin-Peptids.....	40
4.1.2. Darstellung der Verteilung des Ghrelin-Rezeptors	40
4.1.3. Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse von nicht-erkranktem Gewebe	41
4.2. Immunhistochemische Untersuchungen – Studiengruppe, Herzinsuffizienz	41
4.2.1. Darstellung der Verteilung des Ghrelin-Peptids.....	41
4.2.2. Darstellung der Verteilung des Ghrelin-Rezeptors	41
4.2.3. Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse unter pathophysiologischen Bedingungen	41
4.3. Quantifizierende Untersuchungen, RT-PCR – Kontroll- vs. Studiengruppe	45
4.3.1. Nachweis der Ghrelin-mRNA.....	45
4.3.2. Nachweis der Ghrelin-Rezeptor-mRNA	45
4.3.3. Immunhistochemische Darstellung der Ghrelinexpression.....	46
4.3.4. Immunhistochemische Darstellung der Ghrelinrezeptorexpression	47
4.4. Zusammenfassung	47
5. DISKUSSION	49
5.1. Expression des Ghrelin-Peptids bei CHF-Studien	49
5.1.1. Expression des Ghrelin-Peptids, CHF menschliche Individuen.....	49
5.1.2. Expression des Ghrelin-Peptids, CHF Tiermodell	51
5.2. Expression des Ghrelin-Peptids, physiologische Studien	52
5.3. Expression des Rezeptors (GHS-R) in CHF-Gewebe	53

5.4. Expression des Rezeptors (GHS-R) in nicht erkranktem Gewebe	53
5.5. Mögliche Wirkung auf EF	54
5.6. Limitationen der Studie	55
5.6.1 Studiendesign.....	55
5.6.2 Technische Limitationen	56
5.6.3 Unmöglichkeit der Generation einer authentischen Kontrollgruppe	57
5.6.4 Mögliche physiologische Diskrepanz zwischen „in vivo“ und „post-mortem“-Gewebe ..	57
5.6.5 Möglichkeit der Inhomogenität der erworbenen Kontrollen	58
5.7. Zukunft	58
5.7.1. Zukunft – aktuelle Studienlage	58
5.7.2. Ausblick	59
6. ZUSAMMENFASSUNG	61
7. LITERATURVERZEICHNIS	64
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	72
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74
10. DANKSAGUNG	75
11. LEBENSLAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

1. EINLEITUNG

1.1. Herzinsuffizienz

1.1.1. Definition

Das Wort Insuffizienz bedeutet „ungenügende Leistungsfähigkeit“. Die klinische Definition von Herzinsuffizienz bezeichnet die Unfähigkeit des Herzens, periphere Organe in Ruhe oder bei Belastung angemessen mit Blut und somit mit Sauerstoff zu versorgen.

1.1.2. Epidemiologie

Die chronische Herzinsuffizienz stellt eine der häufigsten internistischen Erkrankungen überhaupt dar, in Europa wird die Zahl herzinsuffizienter Patienten auf mehr als 10 Millionen geschätzt [1]. Die Prävalenz und Inzidenz sind altersabhängig. Im Alter zwischen 45 bis 55 Jahren leiden weniger als 1% der Bevölkerung an einer Herzinsuffizienz, zwischen dem 65. und 75. Lebensjahr 2 bis 5 % und bei über 80-Jährigen fast 10 % [1]. Die Krankheitsverteilung zwischen gleichaltrigen Männern und Frauen liegt bei 1:0.97 (21%:20,3%) [2]. Aktuellere Studien beschäftigen sich mit dem Zusammenhang zwischen gesundheitsfördernden Lebensstilfaktoren und einer damit verbundenen Senkung der Prävalenz und einer Senkung des Lebenszeitrisikos, an einer chronischen Herzinsuffizienz (chronic heart failure = CHF) zu erkranken [3].

1.1.3. Klassifikation

Die Herzinsuffizienz wird nach verschiedenen Gesichtspunkten in zwei geläufige Klassifikationen eingeteilt.

Eine Einteilung erfolgt nach den Kriterien der New York Heart Association (NYHA-Klassifikation) nach der Belastbarkeit der Patienten (Tab.1) [4].

Eine weitere gängige Einteilung, die in höherem Grad die Genese und Progredienz der Erkrankung berücksichtigt, erfolgt nach der American Heart Association (AHA-Klassifikation) (Tab.2) [4].

Somit sind beide Einteilungen miteinander konform, wobei in die AHA-Klassifikation mehr Begleitfaktoren und Nebenerkrankungen eingehen und eine bessere Differenzierung ermöglicht.

NYHA-Klasse I entspricht AHA-Klasse A und B, NYHA-Klasse II und III entsprechen AHA-Klasse C. NYHA IV und AHA D sind identisch.

NYHA-Stadium	Subjektive Beschwerden bei Herzinsuffizienz
I	Beschwerdefreiheit, normale körperliche Belastbarkeit
II	Beschwerden bei stärkerer körperlicher Belastbarkeit
III	Beschwerden schon bei leichter Belastbarkeit
IV	Beschwerden in Ruhe

Tabelle 1: Einteilung der Herzinsuffizienz aus Herold – Innere Medizin, S.179, 2006. [4]

Gruppe A	Patienten ohne Symptome einer Herzinsuffizienz, aber mit Risikofaktoren für eine Herzinsuffizienz: > Hypertonie, KHK, Einnahme potentiell kardiotoxischer Medikamente, Alkoholabusus, rheumatisches Fieber in der Eigenanamnese, familienanamnestisches Auftreten einer Kardiomyopathie etc.
Gruppe B	Keine Symptome der Herzinsuffizienz, aber Zeichen einer strukturellen Herzschädigung: linksventrikuläre Hypertrophie u./o. Dilatation, Hyperkontraktilität, Infarktfolgen etc.
Gruppe C	Strukturelle Herzschäden in Verbindung mit Symptomen einer Herzinsuffizienz
Gruppe D	Terminale Herzinsuffizienz

Tabelle 2: ABCD-Stadien der Herzinsuffizienz der American Heart Association (AHA), 2001, aus Herold – Innere Medizin, S.179, 2006. [4]

1.1.4. Ätiologie

Die chronische Herzinsuffizienz ist ein Syndrom unterschiedlicher Ätiologie (Tab. 3) [2, 5]. Symptome einer Herzinsuffizienz basieren bei 80 bis 90% der Patienten auf

einer ventrikulären Funktionsstörung, wovon 60% auf einer systolischen Funktionsstörung mit einer EF (ejection fraction = Auswurfraction) $\leq 40\%$ beruhen [6]. Die häufigste Ätiologie einer Herzinsuffizienz in den westlichen Ländern ist auf das Vorliegen einer arteriellen Hypertonie (49%) (Framingham-Offspring-Studie) und einer koronaren Herzerkrankung (29%) zurückzuführen [2].

Typische klinische Symptome einer Herzinsuffizienz sind Dyspnoe, Müdigkeit und Beinödeme [7].

Hypertonie	49%
Koronare Herzerkrankung	29%
Diabetes mellitus	9%
Herzklappenerkrankungen	8%
LV-Hypertrophie	5%

Tabelle 3: Wesentliche ätiologische Faktoren der Herzinsuffizienz (Framingham Heart Study) [2, 5].

1.1.5. Pathophysiologie

1.1.5.1 Kardiale Veränderungen bei Herzinsuffizienz (HI)

Das Vollbild einer Herzinsuffizienz entsteht, wenn alle kardialen Funktionsreserven und die Aktivierung von funktionellen, strukturellen und molekularen Veränderungen ausgeschöpft sind. Die chronische Nutzung dieser temporär begrenzten Kompensationsmechanismen führen einerseits zu strukturellen Anpassungen (kardiales Remodelling), andererseits zu einer Verschlechterung der Ventrikelfunktion [8] (Tab. 4).

Funktionell	<ul style="list-style-type: none"> • abgeschwächter Frank-Starling-Mechanismus • abgeschwächter/aufgehobener Bowditch-Effekt
Strukturell	<ul style="list-style-type: none"> • LV-Dilatation • Myokardhypertrophie • vermehrte Apoptose
Elektrophysiologisch	<ul style="list-style-type: none"> • Tachykardie • Arrhythmie
Neurohumoral	<ul style="list-style-type: none"> • Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems • Sympathikus-Aktivierung • Steigerung der Endothelin-Synthese, der natriuretischen Peptide, Proinflammatorische Zytokine • Reduktion der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthese (peripher)
Zellulär	<ul style="list-style-type: none"> • Kalziumüberladung • prolongierte Relaxation
Molekular	<ul style="list-style-type: none"> • Expression fetaler Isoformen verschiedener Gene • Induktion von Neurohormonen • Desensitivierung von α-1-adrenergen Rezeptoren • verminderte Expression der sarkoplasmatischen Kalzium-ATPase • vermehrte Expression des sarkolemmalen Natrium-Kalzium-Austauschers

Tabelle 4: Ätiologie der kardialen Veränderungen bei Herzinsuffizienz, modifiziert nach Jackson 2000 [8].

1.1.5.2. Funktionelle Veränderungen des insuffizienten Herzens

a) Frank-Starling-Mechanismus (Kraft-Spannungs-Beziehung)

Der Frank-Starling-Mechanismus beschreibt das Verhältnis zwischen Vordehnung und Kraftentwicklung des Herzens. Nimmt die Vorlast (preload=enddiastolisches Ventrikelvolumen) zu, erhöht sich die Ventrikelspannung und die diastolische Vordehnung des Herzmuskels. Dadurch nimmt innerhalb physiologischer Grenzen das Schlagvolumen

zu. Grundlage des Mechanismus ist eine Empfindlichkeitssteigerung der kontraktilen Proteine durch Kalzium des Herzmuskels. Ist das Herz insuffizient, kann eine weitere Drucksteigerung nur durch überproportionale Preloaderhöhung erreicht werden, die letztendlich zur Dilatation des Ventrikels führt. Bei zunehmender Herzinsuffizienz lässt die Wirksamkeit des Frank-Starling-Mechanismus nach (Abb. 1).

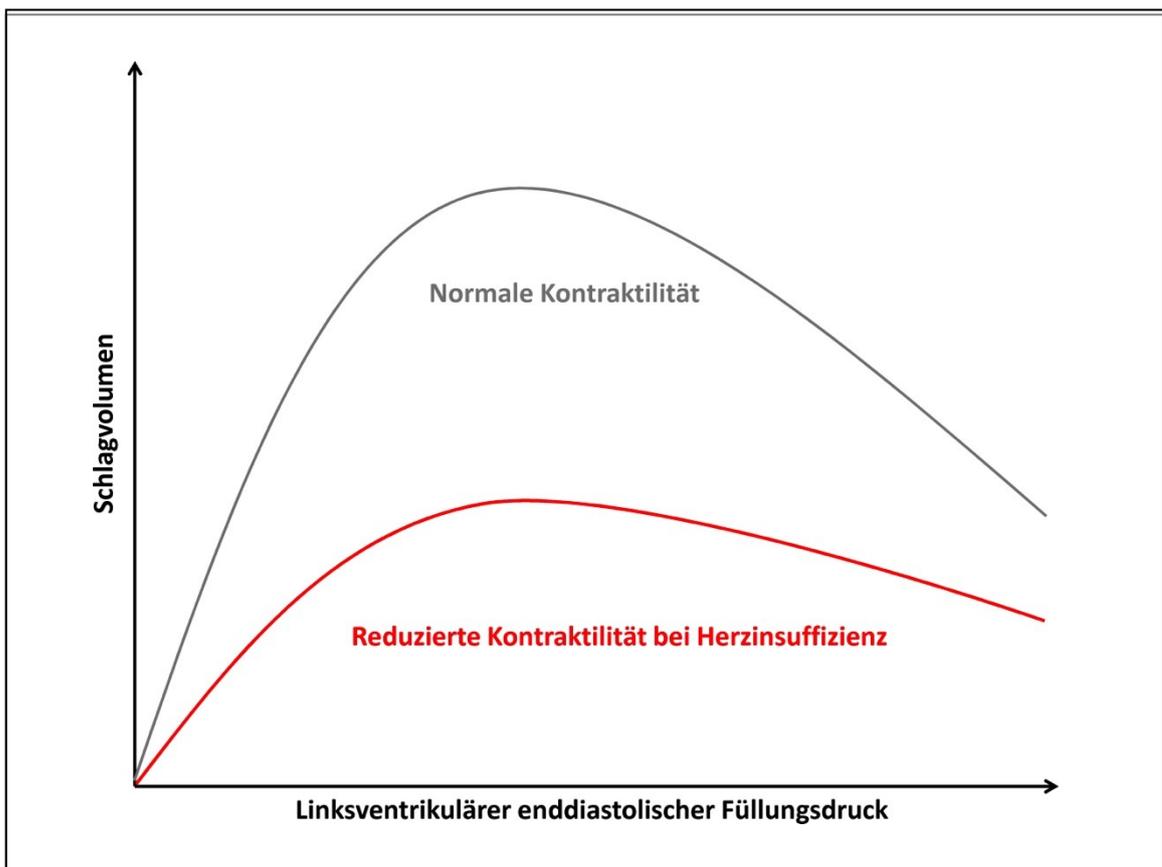


Abbildung 1: Zusammenhang zwischen enddiastolischem Füllungsdruck und Auswurfleistung bei gesunden und herzinsuffizienten Patienten (Modifiziert nach Herold, 2006, S.176 [4]).

b) Bowditch-Effekt (Kraft-Frequenz-Beziehung)

Unter physiologischen Bedingungen führt eine Frequenzsteigerung zur Zunahme der Kontraktilität, die am ehesten auf die Verkürzung der Diastole und eine intrazelluläre Kalziumakkumulation zurückzuführen ist [9]. Dieser Effekt ist am insuffizienten Herzen nicht wirksam – im Gegenteil, bei hoher Herzfrequenz findet eine Kontraktionsabnahme statt [10], die eine Insuffizienz weiter begünstigt.

c) Hormonale Veränderungen auf Herzebene

Adrenerges System

Eine weitere Kontraktilitätssteigerung kann durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems erzielt werden. Dieser Mechanismus findet über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und Stimulation von β -Rezeptoren statt. Die G-Protein gesteuerte Signalkaskade führt über die Aktivierung der Adenylatcyclase zu einer cAMP-Erhöhung. Die Aktivierung cAMP-abhängiger Proteinkinasen steigert das intrazelluläre Kalziumangebot. Effektiv kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von Kalzium aus dem Endoplasmatischen Retikulum und somit zu einer besseren elektromechanischen Koppelung und Kontraktionssteigerung. Somit kann das Vorliegen von chronischer Herzinsuffizienz zu einer dauerhaften adrenergen Stimulation (erhöhte zirkulierende Adrenalin- und Nordrenalinspiegel) als Versuch der Kompensation führen. Die negative Rückkoppelung reduziert die Noradrenalinspeicher und β_1 -Rezeptordichte und führt somit zu einer teilweisen Entkoppelung der β -Adrenorezeptoren [11]. Ein positiv inotroper Reiz geht verloren, der für die insuffiziente Herzleistung verantwortlich gemacht werden kann.

Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Unter physiologischen Bedingungen steuert das RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) über das Hormon Renin die Freisetzung von Aldosteron und Angiotensin II. Das RAAS bewirkt in der Niere die Freisetzung von Renin, das eine Umwandlung von Angiotensinogen zu Angiotensin I und über das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) weiter zu Angiotensin II bewirkt (Abb. 2).

Angiotensin II setzt Aldosteron und Vasopressin frei und wirkt vasokonstriktorisch. Aldosteron und Vasopressin fördern die Natrium- und Wasserrückresorption in den Sammelrohren der Niere und regulieren dadurch indirekt den Blutdruck.

Untersuchungen haben gezeigt, dass Myokardhypertrophie die Arbeitsweise und Synthese von Angiotensin II ACE lokal verstärkt [12]. Ist ein fortgeschrittenes Stadium der Herzinsuffizienz erreicht, wird eine erhöhte zirkulierende Aktivität des ACE gemessen. Angiotensin II spielt pathophysiologisch sowohl aufgrund seiner vaso-konstriktiven und endothelschädigenden Effekte als auch als zentraler Faktor des Remodelings bei Myokardhypertrophie und Myokardischämie eine große Rolle. Zusätzlich bildet das insuffiziente Myokardgewebe lokal Aldosteron, das zur Bindegewebsproliferation und dadurch zur Fibrosierung des Myokards führt [13].

Die Myokardfibrose bewirkt eine Abnahme der Ventrikelbeweglichkeit. Durch Versteifung der beweglichen Bestandteile nimmt die Herzinsuffizienz zu, wodurch die

Beweglichkeit der Ventrikel wiederum abnimmt. Über das RAAS greift Angiotensin II direkt in den Salz- und Wasserhaushalt der Niere ein und beeinflusst den peripheren Widerstand und quantitativ das Blutvolumen und initiiert somit kompensatorisch eine Erhöhung des Blutdrucks.

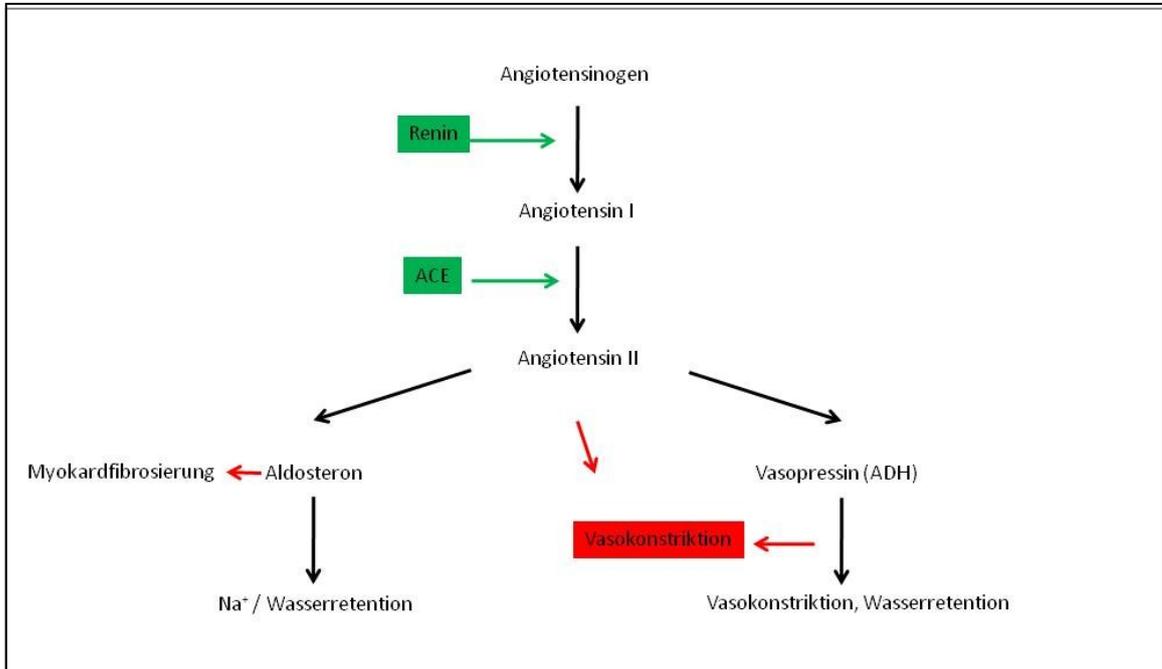


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktionsweise des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (Modifiziert nach [14]).

d) Strukturelle Veränderungen des Herzens

Der pathophysiologische Verlauf bei Herzinsuffizienz zieht strukturelle Veränderungen des Myokardgewebes nach sich, die für eine rasche Progredienz der Erkrankung verantwortlich sind. Man spricht vom sogenannten „kardialen Remodeling“.

Liegt eine arterielle Hypertonie oder eine Aortenklappenstenose vor, kann es zu einer Drucküberlastung des Ventrikels kommen. Reaktiv nimmt zunächst die Wanddicke zu (konzentrisches Remodeling), bei weiterer Zunahme der Wanddicke kann ein sogenanntes „kritisches Herzgewicht“ von ca. 500g überschritten werden und es kommt zur *konzentrischen Hypertrophie*. Diese konzentrische Hypertrophie verursacht sekundär eine Dilatation des linken Ventrikels, die zum Kontraktilitätsverlust und somit zur Manifestation einer Herzinsuffizienz führen kann.

Bei Vorliegen einer Aortenklappeninsuffizienz, schweren Anämien oder eines Shuntvitiums findet eine Volumenüberlastung des Herzens statt, die zur Zunahme des linksventrikulären Diameters führt. Nimmt der linksventrikuläre Durchmesser zu, liegt eine *exzentrische Hypertrophie* vor. Die reduzierte Nachlast im fortgeschrittenen Stadium

der Erkrankung bewirkt einen Kontraktilitätsverlust und fördert die Entstehung einer Herzinsuffizienz.

Auch nach stattgehabtem Myokardinfarkt laufen strukturelle Umbauprozesse am Herzen ab. Es kann nicht zwischen Veränderungen der Myokardinfarktnarbe und dem primär nicht betroffenen Myokard unterschieden werden. Die Veränderungen des infarzierten Myokardgewebes werden anhand einer progredienten Ausdünnung, einer Expansion des Narbengewebes sowie einer *konzentrischen Hypertrophie* des nicht betroffenen Gewebes sichtbar.

Das Laplace'sche Gesetz beschreibt als wesentlichen Faktor der Umbauvorgänge des Herzmuskels die Wandspannung ($T_w = p \times r/2D$). Aus dieser Gesetzmäßigkeit folgt, dass ein Druckanstieg oder der Anstieg des linksventrikulären Diameters zu einem erheblichen Anstieg der Wandspannung führt. Kompensatorisch nimmt die Wanddicke zu, die bei postmitotischen Herzmuskelzellen nur durch myozytäre Hypertrophie erreicht werden kann. Myokardhypertrophie und die wandspannungsbedingte Änderung der Ventrikelstruktur sind entscheidende Kriterien für die Entstehung der chronischen Herzinsuffizienz. Klinische Studien an hypertrophiertem Herzgewebe zeigen, dass nicht alle Zellen dieser Veränderung unterworfen sind. Die gesteigerte Wandspannung lässt einige Herzmuskelzellen mittels Apoptose (aktive Form des Zelltods) absterben [15, 16]. Zudem werden strukturelle Umbauprozesse am Herzen durch ein gesteigertes RAAS und eine Aktivierung des Sympathikus gefördert (siehe Abb. 2).

Durch Zunahme von kollagenem Bindegewebe kommt es strukturell zur Myokardfibrosierung, die eine diastolische Funktionsstörung des hypertrophierten Herzens begünstigt [17]. Bei Chronifizierung der Herzinsuffizienz nimmt die Pumpleistung ab, periphere Organe und Gewebe werden minderperfundiert. Bis zu einem gewissen Grad ist das neurohumorale System in der Lage, diese pathophysiologischen Veränderungen durch Änderung des adrenergen Systems und des RAAS zu kompensieren.

Das zentrale Nervensystem (ZNS) vermittelt über Barorezeptoren die Freisetzung von Vasopressin und die Aktivierung des sympathischen Nervensystems. Zudem steigert die Niere über das RAAS die Synthese und Freisetzung von Aldosteron. Das Herz kann natriuretische Peptide produzieren, die das Gefäßsystem dazu veranlassen, mehr Stickstoffmonoxid, Endothelin-1 und Bradykinin auszuschütten, die allesamt vasodilatatorisch wirken.

Das autonome Nervensystem reduziert parasympathische Einflüsse, wirkt auf das kardiale System positiv-inotrop, steigert dadurch die Herzfrequenz, den peripheren

Widerstand, setzt Neurohormone und immunologische wachstumsinduzierende Faktoren frei. Die chronisch kompensatorische Sympathikusstimulation steigert Vor- und Nachlast des Herzens, führt über disregulierte Salz- und Wasserretention zur Zunahme des Blutvolumens und erhöht die kardiale Wandspannung. Eine Erhöhung der Wandspannung erfordert einen gesteigerten Sauerstoffverbrauch und begünstigt Umbauprozesse im Sinne des kardialen Remodelings und das Entstehen einer Myokardischämie.

Neben Vasopressin, Endothelin, natriuretischen Peptiden und Bradykinin wirken kompensatorisch auch Neurohormone, wie Ghrelin den Auswirkungen der chronischen Herzinsuffizienz mit ihren positiv inotropen Eigenschaften entgegen.

1.2. Definition

Ghrelin ist ein neuartiges Peptid, das das Wachstumshormon Growth Hormone (GH, Somatotropin) aus der Hypophyse freisetzt [18] (Erstbeschreibung durch Kojima et al 1999). Erstmals wurde Ghrelin aus dem Magen von Nagetieren als endogener Ligand für den Hormonrezeptor GHS-1a isoliert. Es spielt eine große Rolle bei der Regulation der Freisetzung von GH, übt aber auch vielseitige andere Funktionen auf Nieren, Pankreas, Gonaden, Nahrungsaufnahme, Kohlehydratstoffwechsel, Zellproliferation und Herz aus [19]. Neuere Studien untersuchen den Einfluss von Ghrelin auf die Herzfunktion und Herzleistung bei gesunden und herzinsuffizienten Patienten [20]. Diese besagen, dass Ghrelin Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System durch spezifische Rezeptoren ausübt, die in Blutgefäßen und den Ventrikeln vorkommen. Sie beeinflussen positiv die linksventrikuläre Pumpfunktion des Herzens und die kardiale Kachexie terminal herzinsuffizienter Patienten und wirken somit positiv chronotrop und inotrop [21]. Die Rezeptoren, an denen Ghrelin positiv inotrop wirkt, befinden sich ubiquitär in Blutgefäßen und dem Herzen.

1.3. Geschichte

Die Suche und die Entdeckung von GHS (Growth Hormone Stimulant = GH freisetzende Substanz) ereigneten sich mehr oder weniger zufällig bei Studien auf der Suche nach Opioid-Peptiden während der 1970er Jahre. Der Nachweis von Enkephalin als endogener Ligand des Morphinrezeptors forderte aus wissenschaftlichem Interesse die Synthese von zahlreichen Opioid-Derivaten, die bei höherer Wirksamkeit ein geringeres Abhängigkeitspotential besitzen sollten.

1977 entdeckten Bowers und Mitarbeiter einige Opioid-Peptidderivate, die „als Nebenwirkung“ eine schwache GH-Freisetzung aus der Hypophyse bewirkten [22]. Sie hatten zwar keinerlei opioide Wirkung, setzten aber geringe Mengen von GH frei. Man

bezeichnete sie als GHSs (GH-Secretogues) [22, 23]. Der erste entdeckte GHS bewirkte eine direkte GH-Freisetzung der Hypophyse und war ein synthetisches Derivat von Methionin und Enkephalin. Strukturell ist die zweite Aminosäure Glycin durch ein D-Tryptophan ersetzt und am C-terminalen Ende befindet sich eine Amidgruppe. Es zeigte sich, dass für die Funktionsweise der GHS viele hydrophobe Seitenketten essentiell sind [23]. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte die GH-Ausschüttung nur in vitro nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse erforderten die Herstellung mehrerer Peptidderivate mit größerer Wirksamkeit. 1993 stellte die Forschungsgruppe um Smith ein nichtpeptisches GHS, L-692,429, (MK-0677) her, das zur oralen Applikation geeignet war. Das Ziel weiterer klinischer Studien war es, einen eventuellen klinischen Gebrauch zu ermöglichen [24]. Eine japanische Gruppe von Forschern um Kojima stellten 1999 synthetische Moleküle her, die mittels eines G-Protein-gesteuerten Rezeptors über einen unbekanntem Liganden die Freisetzung von Somatotropin aus der Hypophyse stimulierten [18]. Bis heute gelten Kojima et al. als Wegbereiter der Forschungsansätze zu Ghrelin. Sie beschäftigen sich bis heute mit den vielfältigen Funktionen dieses Peptids in verschiedenen Stoffwechselwegen. Im Rahmen dieser genannten Untersuchungen wurde die Funktion der GHS spezifiziert: die GH-Freisetzung aus der Hypophyse wird durch das GH-Releasinghormon (GHRH) des Hypothalamus stimuliert. Exogen applizierte GHS unterscheiden sich durch einen anderen Weg der GH-Sekretion von den GHRH des Hypothalamus [25-29]. Die Bindung von GHRH und seinem Rezeptor erhöht die intrazelluläre Konzentration des second messengers cAMP und die intrazelluläre Kalziumkonzentration. GHSs wirken auf einen anderen Rezeptor, der über einen anderen Signalübertragungsweg mit IP₃ (Inositoltriphosphat) die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration die Freisetzung von GH aus der Hypophyse bewirkt [30]. Beide Wege führen über unterschiedliche Mechanismen zum selben Ergebnis (Abb. 3).

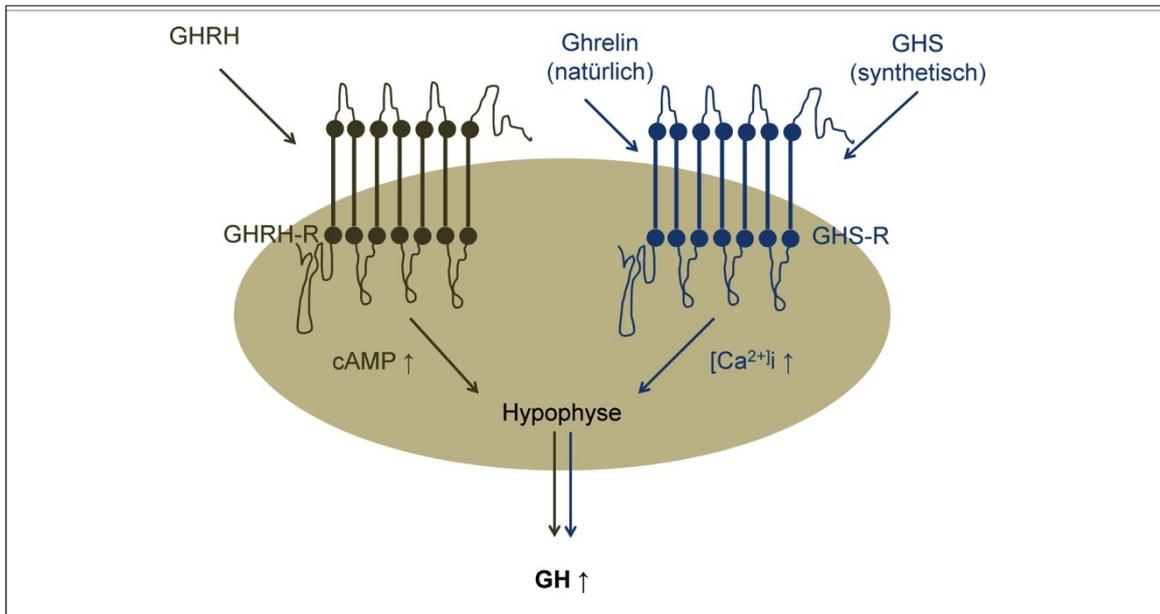


Abbildung 3: Die Regulation der Wachstumsfreisetzung über zwei verschiedene Signalkaskaden (via cAMP-Erhöhung und IP_3 -Freisetzung). Modifiziert nach Kojima, M. and K. Kangawa, *Ghrelin: structure and function*. *Physiol Rev*, 2005. 85(2): p. 495-522.

Der Großteil klinischer Forschungen beschränkt sich auf die Rolle und den Mechanismus der Regulation des GHRH von den somatotropen Hypophysenzellen. Im Vergleich von GHRH und GHRP-6 wurde in Studien gezeigt, dass GHRH eine stärkere GH-Stimulierung in vitro während GHRP-6 stärker auf die GH-Stimulierung in vivo wirkt [31]. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Peptiden besteht in ihren unterschiedlichen Rezeptoren. Zum jetzigen Zeitpunkt wurden verschiedene GHRP-6-Analoga entdeckt, die bei oraler Applikation einen merklichen Effekt und eine hohe Bioverfügbarkeit besitzen. 1996 konnte erstmals der GHS-Rezeptor (GHS-R) geklont werden. Nach diesem Erfolg folgte eine Reihe von Studien zu unterschiedlichen Fragestellungen über MK-0677 - bis heute der wirkungsvollste bekannte GHS [32]. Anhand der Untersuchung mehrerer Gewebeproben aus Gehirn, Lunge, Herz, Nieren, Magen und dem Dünndarm identifizierte man als weiteren Fortschritt den endogenen GHS-Rezeptor-Liganden. Gegen die allgemeine Vorstellung, dass der Hauptteil des Liganden in der Hypophyse produziert werde, wurden hohe Aktivitäten im Magen nachgewiesen [18].

Das für diesen Effekt verantwortliche Molekül sollte Ghrelin heißen, von „*ghre-*“ aus dem indoeuropäischen Wortstamm des Wortes „Wachsen“.

Auf die Entdeckung des Ghrelinpeptids trifft die Begrifflichkeit „orphan receptor“ (engl. = Waise) zu, die den GHS-R1a über die vorherige Entdeckung des Liganden Ghrelins beschreibt. Der Rezeptor selbst wurde 20 Jahre später anhand der spezifischen Bindung von synthetisch hergestellten GHS gefunden [18, 31, 33-37]. Ghrelin ist ein

Beispiel für die sog. „Umgekehrte Pharmakologie“, begonnen mit der Herstellung von synthetischen Analoga und beendet mit der Entdeckung eines natürlichen Liganden durch die initiale Entdeckung des Rezeptors. Die synthetisch hergestellten GHS bilden eine Familie aus peptischen und nicht-peptischen Molekülen (Tab. 5) [31, 35, 38-47]. Erste synthetische GH-freisetzende Moleküle, Met-Enkephalin-Derivate ohne Opioid-eigenschaften wurden von Bowers und Momany am Ende der 70er Jahre hergestellt [23, 38, 40, 48] (Abb. 4).

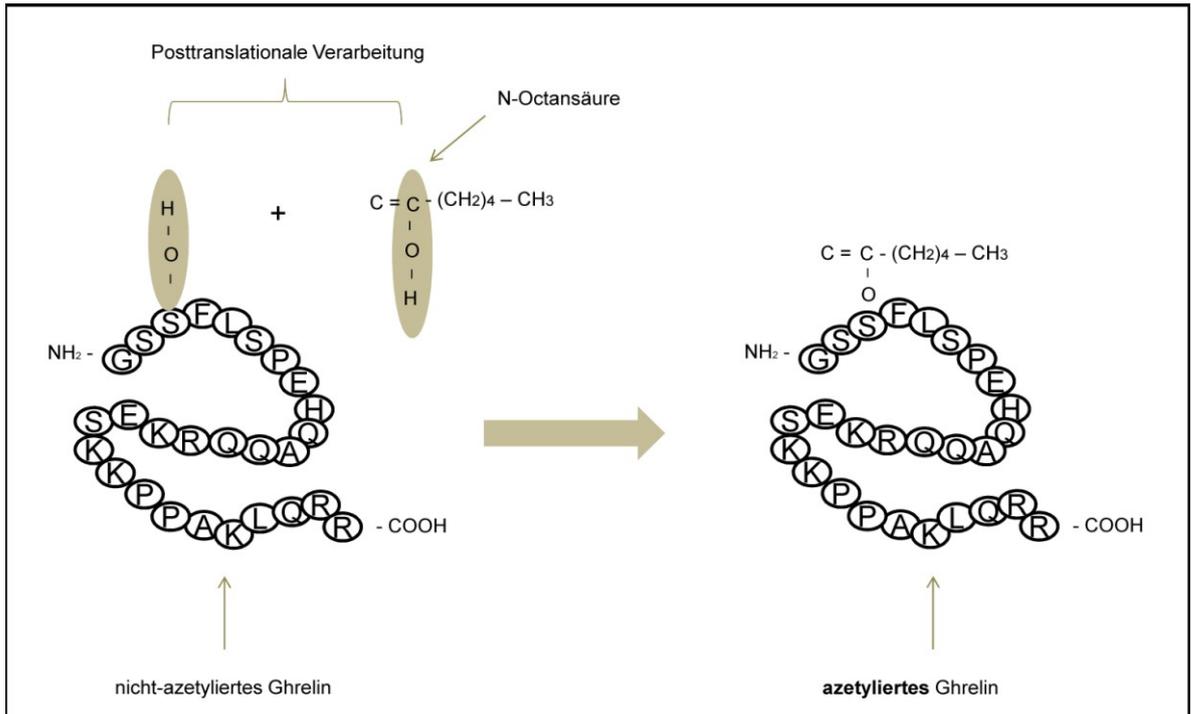


Abbildung 4: Strukturelle Differenzierung zwischen acetyliertem Peptid (aktive Form) und nicht azetyliertem Peptid (nicht-aktive Form). Modifiziert nach van der Lely et al. 2004 [49].

Jahr	Peptische GHS (GHRPs)	Nichtpeptische GHS
1977	(D-Trp ²)-metenkephalin	
1984	GHRP-6	
1991	GHRP-1	
1992		L-692, 429
1993	GHRP-2	
1994	Hexarelin	L-692, 585
1995		MK-0677
1996	EP-51389	
1998	Ipamorelin	
1999		NN-703
2000		CP-424, 391
2001		SM-130686
2002		EP-01572

Tabelle 5: Studien zu peptischen und nichtpeptischen GHS. Modifiziert nach van der Lely et al. 2004 [49].

1.4. Bedeutung für das kardiovaskuläre System

Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit der Wirkung von GHS auf Inotropie unter physiologischen Bedingungen. Die Differenzierung, ob diese Wirkungen indirekt durch eine Vasodilatation oder direkt durch erhöhte GH-Ausschüttung und GH-Wirkung ausgelöst werden, konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Eine Steigerung der systolischen Funktion ohne Erniedrigung des peripheren Widerstands wurde nachgewiesen. Die Steigerung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) konnte bereits 15 Minuten nach parenteraler Hexarelingabe bei Gesunden [50] und bei Patienten mit GH-Mangel [51] ohne signifikante Blutdrucksenkung beobachtet werden. Analoge Studien belegen 30 Minuten nach subkutaner Ghrelinapplikation eine Erhöhung der LVEF und des endsystolischen Volumens ohne Änderung des Blutdrucks oder der Herzfrequenz [52]. Verantwortliche Effekte sind weitgehend unbekannt. Einige positive Wirkungen auf die Kontraktilität lassen sich durch eine erhöhte GH-Ausschüttung erklären, die möglicherweise durch eine Veränderung der Ca²⁺-Übertragung experimentell positiv inotrop wirken [53], andere Hypothesen lassen auf vasodilatatorische Effekte schließen.

1.4.1. Vasodilatation

2003 untersuchten Shimizu et al. eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion durch Ghrelin bei Ratten, die infolge eines GH-unabhängigen Effekts für eine Zunahme der eNOS (endotheliale Stickstoffoxid-Synthase) verantwortlich ist [54]. Durch Zunahme der eNOS wird ubiquitär der Kaliumeinstrom in die Zellen gefördert. Dieser Einstrom löst wiederum eine Hyperpolarisation der Zellmembran aus, relaxiert die glatten Muskelzellen durch Stimulation einer cGMP-abhängigen Protein-Kinase und bewirkt eine Vasodilatation. Derselbe Mechanismus konnte bei weiteren Studien nach Ghrelingabe reproduziert werden und lässt damit den Rückschluss auf eine Vasodilatation mit deutlichem Blutdruckanfall zu [55, 56]. Die intravenöse Applikation von Ghrelin senkt den mittleren arteriellen Blutdruck und steigert die Ejektionsfraktion und den Schlagvolumenindex [30]. Hedayti et al. beschäftigten sich 2009 mit dem direkten Einfluss von Ghrelin auf kardiovaskuläres Gewebe und Endothelien. Tierexperimentelle Versuche mit porcinem Koronargewebe und menschlichem Endothel konnten protektive Effekte durch Steigerung der NOS-Freisetzung und Reduktion des oxidativen Stresses zeigen [57].

1.4.2. Kardioprotektive und antiischämische Effekte

Die positiven Auswirkungen von GHS auf myokardiale Ischämie beschäftigten eine Forschungsgruppe um De Gennaro Colonna, die Ratten mit GH-Mangel für 14 Tage mit Hexarelin oder GH behandelten. Nach Tötung der Tiere wurden deren Herzen einer retrograden Aortenperfusion unter ischämischen Bedingungen unterzogen. Die Kontrollgruppe, Ratten mit GH-Mangel ohne GH- oder Analoga-Behandlung, zeigten einen deutlichen Anstieg des LVEDP (linksventrikulärer enddiastolischer Druck) und einen geringen Wiederanstieg der Kontraktilität. Ratten, die zuvor mit Hexarelin oder GH behandelt wurden zeigten eine normale Herzfunktion [58].

1.4.3. Experimentelle Versuche bei pulmonaler Hypertonie

Als Ursache für die Entstehung einer pulmonalen Hypertonie ist meist eine Volumenbelastung des rechten Herzens durch erhöhte systemische Widerstände zu diagnostizieren. Die Veränderungen gehen einher mit Erhöhung des Pulmonalarteriendruckes, des systemischen Widerstandes und Hypertrophie des rechten Ventrikels. Durch diese pathophysiologischen Veränderungen besteht eine enge Assoziation mit dem Entstehen einer Herzinsuffizienz und dadurch mit erhöhter Mortalität. Aktuelle Studien ergaben, dass Ghrelin und seine Peptide stark vasodilatatorisch wirken und durch ihre modulierende Wirkung auf den

Pulmonalarteriendruck und die Endothelzellen dem rechtsventrikulären Remodeling entgegenwirken [59].

1.4.4. Experimentelle Studien bei Herzinsuffizienz

Bei herzinsuffizienten Ratten ließ sich die EF durch Ghrelingabe steigern [60]. Nagaya et al. reproduzierten dieses Ergebnis mit der Gabe von 100 µg Ghrelin/Tag [61]. In vitro-Versuche zeigten einen protektiven Effekt bei ischämischer Reperfusion an isolierten Rattenherzen [62]. Die subkutane Ghrelinapplikation verbesserte die linksventrikuläre Dysfunktion und die Ausprägung kardialer Kachexie [63]. Nagaya et al. bewirkten an 10 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz nach intravenöser Ghrelingabe einen Anstieg der linksventrikulären Auswurffraktion und eine Zunahme der Muskelmasse des linken Ventrikels [20]. Darüber hinaus inhibiert Ghrelin die Apoptose von Kardiomyozyten und Endothelzellen [64] und unterbindet den Einfluss des sympathischen Systems durch Supprimierung von Norepinephrin [20, 64].

1.4.5. Klinische Möglichkeiten für Ghrelin und GHS bei Herzinsuffizienz

Momentan gibt es wenige Arbeiten, die sich durch die Auswirkungen von GHS und Ghrelin mit einer Verbesserung der Herzleistung beschäftigen, aber doch einige, die durch direkte Hexarelin-Gabe einen Leistungszuwachs bei ischämischen Kardiomyopathien belegen. Bei dilatativen Kardiomyopathien konnte kein Leistungszuwachs nachgewiesen werden [65]. In einer weiteren Studie wurde bei 12 chronisch herzinsuffizienten Patienten durch direkte Ghrelin-i.v.-Gabe (vs. Placebo) ein signifikanter Anstieg der LVEF und des Schlagvolumen-Index sowie eine Herabsetzung des peripheren Widerstandes innerhalb von 60 min beobachtet. Bei anästhesierten Patienten, die sich einer Bypass-Operation unterzogen, wurde durch kurzfristige Hexarelin-Gabe die Steigerung der LVEF, der EF und des mittleren arteriellen Blutdrucks ohne Änderung des peripheren Widerstandes erreicht [66]. Nagaya et al. veröffentlichten 2002 als damals erste und bis jetzt einzige Gruppe eine Studie über Ghrelin-Gabe bei CHF-Patienten über einen Zeitraum von drei Wochen. Diese ergab einen signifikanten Anstieg der LVEF, der linksventrikulären Muskelmasse und des linksventrikulären enddiastolischen Volumens. Weiter wurde sowohl eine Steigerung der Herzleistung als auch eine maximale Sauerstoffausbeute bei Belastung und ein abgesunkener Norephidrin-Plasmaspiegel gemessen [20]. Der limitierende Faktor der Erkrankung „chronische Herzinsuffizienz“ besteht nicht allein aus den Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System, sondern auch erheblich am Syndrom Kachexie mit Gewichtsverlust und dem ubiquitären Untergang von Muskelgewebe. Diese Ergebnisse

lassen trotz bis dato fehlender Langzeitstudien auf therapeutisch brauchbare Ansätze bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz hoffen.

1.5. Physiologische Funktionen von Ghrelin

1.5.1. Aktivierung der GH-Freisetzung

Ghrelin und synthetische GHS verursachen eine streng dosisabhängige GH-Ausschüttung im Hypophysenvorderlappen mit einer stärkeren Ausprägung bei Menschen als bei Tieren [18, 31, 35, 67-69]. Frühere Studien belegen, dass Ghrelin eine starke, dosisabhängige und spezifische Wirkung auf die Freisetzung von GH bei Ratten und anderen Säugetieren in vitro und in vivo besitzt [70-73]. Die Ergebnisse korrelieren mit denen am Menschen [68, 69, 74-76]. Das Peptidhormon Ghrelin übt vielseitige Wirkungen auf unterschiedliche Systeme des Körpers aus (Abb. 5).

Es stimuliert hauptsächlich Hypophysenzellen, woraus sich folgern lässt, dass es direkt auf die Hypophyse wirkt [69]. Ebenfalls scheint der Hypothalamus an der Ghrelin-vermittelten Stimulierung der GH-Freisetzung beteiligt zu sein, da Patienten mit Läsionen der Hypothalamusregion trotz Ghrelingabe eine Insuffizienz der GH-Freisetzung zeigen [77]. Ghrelin bewirkt durch den GHS-R mittels IP_3 eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die aus der Hypophyse GH freisetzt. Es erhöht die Spiegel von ACTH, Kortisol, Aldosteron, Prolaktin und Epinephrin in vivo, wirkt aber nicht auf die Plasmaspiegel von TSH oder Gonadotropin [67, 69]. Diese Effekte werden erst bei Ghrelingabe oberhalb der physiologischen Spiegel erreicht [69].

Hormonsekretion	
GH-Freisetzung	↑
ACTH Freisetzung	↑
Cortisol Freisetzung	↑
Prolaktin Freisetzung	↑?↓
Insulin Freisetzung	↑
Anabole Effekte	
Appetit	↑
Adipositas	↑
Blutglukosespiegel	↑
Magen	
Magensäuresekretion	↑
Magenmotilität	↑
Umsatz der Magen- und Intestinalmukosa	↑
Kardiovaskuläre Funktionen	
EF	↑
Blutdruck	↓

Abbildung 5: Effekte von Ghrelin, ↑Anstieg, ↓Abfall. Modifiziert nach Kojima et al [30].

1.5.2. Regulation des Essverhaltens, des Appetits und des Körpergewichts

Ghrelin wurde als erstes Hormon identifiziert, das die Nahrungsaufnahme stimuliert und im Magen entsteht [78, 79]. Neueste Studien, die sich mit synthetischen GHS befasst haben, zeigen einen hohen Einfluss von Ghrelin auf die Regulation des Energiehaushaltes [45, 80]. Dieser Aspekt ist durch eine mögliche auftretende Kachexie im Verlauf einer Herzinsuffizienz für unsere Fragestellung von großem Interesse. Im Tierversuch führt die exogene Ghrelingabe durch Steigerung des Appetits und einer verminderten Fettverbrennung zu einer Zunahme des Körpergewichts. Diese Effekte werden GH-unabhängig zum großen Teil von einem zentralen Netzwerk von Neuronen vermittelt, das auch von Leptin abhängig ist. Ghrelin und Leptin sind zwei unterschiedliche Stoffe, die sich durch ihre gegenläufige Wirkungsweise zur Regulation des Energiehaushaltes ergänzen [81]. Ghrelin induziert durch ein gesteigertes Hungergefühl die Nahrungsaufnahme, Leptin hemmt das

Auftreten von Hungergefühlen. Studien am Menschen zeigen, dass eine positive Energiebilanz (Adipositas, akute Nahrungsaufnahme) die zirkulierenden Ghrelin-Plasma-Spiegel erniedrigt, bei negativer Energiebilanz (Fasten, Anorexia nervosa) erhöht [45, 82-85]. Die Stimulation von Rezeptoren, die die Nahrungsaufnahme fördern, werden durch GHS vermittelt und durch GHS-Antagonisten unterdrückt [86]. Bei Mäusen mit GHS-R-Mangel ist keine Steigerung der Nahrungsaufnahme durch exogene Ghrelingabe möglich [87]. Am Menschen wurde auch eine Steigerung des Appetits und der Nahrungsaufnahme unter physiologischen Bedingungen gezeigt [88]. Ghrelin kann hinsichtlich der Evolution als Mediator eines Mechanismus angesehen werden, der durch GH-unabhängige Nahrungsaufnahme zur Energiebilanz beiträgt und zum Überleben dient: der Reiz zur Nahrungsaufnahme und zur Speicherung von Energiereserven in Form von Fett, die in Hungerszeiten das Überleben begünstigen [89]. Kachexie stellt als Resultat einer Herzinsuffizienz einen Stoffwechsellzustand dar, bei dem ein anaboler Stoffwechsellzustand zum Überleben beitragen kann.

1.5.3. Immunmodulation

Die Expression der GHS mRNA in vielen lymphatischen Organen [90], sowie B- und T-Zellen und Monozyten [91], lässt vermuten, dass Ghrelin auch das Immunsystem beeinflusst. So zeigten verschiedene Studien, dass Ghrelin die Proliferation der Immunzellen und die Aktivierung und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen abstimmt. Es bekam eine neue Rolle als Regulator in der Funktion von Immunzellen, der die Expression von proinflammatorischen Zytokinen mindert. Ghrelin fördert die Synthese von anorexiefördernden proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 1 β (IL-1 β), IL-6 und dem Tumornekrosefaktor α (TNF α) [91-93]. Im Tierversuch bewirkt eine dauerhafte Ghrelingabe die Stimulation des Wachstums und der Differenzierung von Thymuszellen und eine Steigerung der T-Zell-Produktion. Bei den Tieren, die zuvor mit Lymphom-Zellen geimpft waren, entstand eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen die Aktivierung neoplastischer Zellen [94]. Einige Forscher konnten unter in vitro Bedingungen nachweisen, dass Ghrelin auch die reaktive Sauerstoffspezies vermindert [95]. Die positive Immunmodulation ist belegt.

1.5.4. Zellproliferation

Neueste Studien zeigen regulatorische Einflüsse von Ghrelin auf die Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung von normalen und neoplastischen Zellreihen.

Ghrelin fördert die Proliferation und hemmt die Apoptose verschiedener Zellen: Kardiomyozyten (H9c2-Zelllinie) [96], Zellen in der Zona glomerulosa der menschlichen Nebenschilddrüse [97], Präadipozyten [98], Osteoblasten [99], B-Zellen des Pankreas

[100] und Hautzellen [101]. Da Ghrelin und GHS-Rezeptoren oft gemeinsam in Tumorgewebe exprimiert werden, wird angenommen, dass das Ghrelin-System eine autokrine/parakrine Rolle bei der Entwicklung neoplastischer Zellen spielt. Verschiedene Experimente zeigten *in vitro* einen antiproliferativen Effekt von Ghrelin auf einige menschliche Tumorgewebe: bei kleinzelligen Karzinomen [102], Mamma- [19], Schilddrüsen- [103] und Prostatakarzinomzelllinien [104]. Gegenteilige Effekte wurden bei Leber- [105], Prostata- [106] und Pankreaskarzinomzellreihen [107] gezeigt. Zusätzlich scheint Ghrelin die Proliferation neoplastischer Zellen zu regulieren, indem Angiogenesefaktoren gehemmt werden.

1.5.5. Stoffwechsel

1.5.5.1. Glukosestoffwechsel

Ghrelin greift über Modulation der Sensitivität von glukosesensitiven Neuronen des ZNS, der Insulinsekretion und der hepatischen Glukoseproduktion in die Regulation des Glukosestoffwechsels ein und hemmt die Aktivität glukoseempfindlicher Neuronen im dorsalen Vaguskomplex [108, 109]. Die endogene Glukoseproduktion wird durch Hemmung der Synthese von Adiponectin [110], einem Stoff, der die Empfindlichkeit der Zielgewebe auf Insulin steigert, herabgesetzt [109, 111]. Abhängig von den Versuchsbedingungen konnte Ghrelin bei Untersuchungen am Menschen und im Tierversuch die Insulinsekretion entweder stimulieren oder hemmen [112]. Wird Ghrelin direkt verabreicht, steigt beim Menschen der Plasmaglukosespiegel an [112].

Zusammenfassend lässt sich der hyperglykämische Effekt von Ghrelin nicht nur durch den endokrinen Effekt des Ghrelin erklären, sondern auch durch die direkten Effekte auf Hepatozyten, die die Glykogensynthese, die Glukoneogenese und die hepatische Glukoseproduktion stimulieren [105, 113].

1.5.5.2. Lipidstoffwechsel

Ghrelin wirkt auf den Lipidstoffwechsel durch Effekte auf Leber, Skelettmuskel und Fettgewebe. In der Leber wirkt es positiv auf die Genexpression zur Entstehung von Fettgewebe und Triglyceriden. Durch die Reduktion des fettsäurereduzierenden Proteins AMPK (aktivierte Proteinkinase) wird ein anaboler Fettstoffwechselzustand begünstigt [114]. In der Skelettmuskulatur reduziert Ghrelin den Triglyceridgehalt durch Erhöhung der mitochondrialen Enzymaktivität und speichert Triglyceride als Energieträger in der Leber. Zusätzlich wird die Lipogenese ausdifferenzierter Adipozyten *in vitro* und *in vivo* durch eine Erhöhung der insulinabhängigen Glukoseaufnahme stimuliert [115, 116]. Fasst man die Wirkungen von Ghrelin auf den Lipidstoffwechsel

zusammen, hemmt es die Lipolyse in vitro [117], stimuliert die Differenzierung und Ausreifung von Vorläuferzellen der Adipozyten [98] und wirkt somit anabol.

Da bei chronisch herzinsuffizienten Patienten krankheitsbedingt eine katabole Stoffwechsellage vorliegt, kann Ghrelin durch Genexpression Zellen vor Energiemangel schützen, indem die Enzyme energieaufwändiger Biosynthesevorgänge gehemmt werden - beispielsweise die AMPK mit den Enzymen HMG-CoA-Reduktase und Acetyl-CoA-Carboxylase.

1.5.5.3. Gastrointestinale Funktionen

Dem Ursprung von Ghrelin im Magen berücksichtigt, beschäftigen sich viele Studien damit, ob Ghrelin Auswirkungen auf den Magendarmtrakt ausübt. Im Vordergrund stehen die exokrine Magensekretion, Magenmotilität und protektive Effekte auf das Epithel. Leider zeigen verschiedene Studien teils kontroverse Ergebnisse hinsichtlich der Wirkung von Ghrelin auf die Magensäureproduktion. Die verschiedenen Ergebnisse bedingen sich mutmaßlich durch verschiedene Signalwege oder durch unterschiedliche Test- bzw. Versuchsbedingungen. Einerseits wird eine Stimulation der Magensäuresekretion (eventuell über vagale Signalwege, die Parietalzellen stimulieren) hervorgerufen [118], andererseits gehemmt [119], oder es wurde gar kein Effekt erzielt [120]. Die stimulierende Wirkung von Ghrelin auf die Magensäuresekretion, um den Magen auf eine Passage mit Nahrung vorzubereiten, veranlasst das Pankreas über zentrale Bahnen zur Insulinsekretion [121].

Ein magenschützender Effekt von Ghrelin kann durch Signale von vagalen und sensorischen Nerven verursacht werden, die durch Hyperämie der Magenschleimhaut zustande kommen. Ghrelin proliferiert und differenziert die Zellen des Epithels im Verdauungstrakt [122, 123].

1.5.5.4. Steigerung der Herzleistung

Da die Expression der mRNA von Ghrelin und dessen Rezeptor in Herzgewebe und zentralen Gefäßen nachgewiesen werden konnte [55, 90, 124], stellen wir im Sinne unserer Fragestellung die Hypothese auf, dass das ubiquitäre Vorkommen im Zusammenhang mit der Ghrelinwirkung auf das kardiovaskuläre System steht. Wird Ghrelin intravenös als Bolus appliziert, erniedrigt sich dadurch der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) ohne Änderung der Herzfrequenz [55, 125] und Erhöhung des Herz- und Schlagvolumenindex (SVI). Die Summe der Veränderungen dieser Parameter steht für eine Steigerung der Herzleistung.

Placebokontrolliert zeigte sich bei herzinsuffizienten Ratten, die mit Ghrelin behandelt wurden, eine Erhöhung des Schlagvolumens und der Auswurfleistung sowie eine

Zunahme der Wanddicke des linken Ventrikels (dP/dt -[max]) [21]. Die Tiere profitierten darüber hinaus von der Ghrelinbehandlung durch eine Zunahme der diastolischen Wanddicke der nichtinfarzierten Wand und der Hemmung von weiterer Dilatation des linken Ventrikels [61]. Diese Veränderungen wirken dem kardialen Remodeling und der kardialen Kachexie entgegen und steigern folglich die Herzleistung [126].

Ghrelin senkt durch sympathische Hemmung die HF, wodurch eine verlängerte Diastole durch eine stärkere Koronardurchblutung die Pumpfunktion bessert.

1.6. Lokalisation

Ein Großteil der ghrelinproduzierenden Zellen befindet sich bei allen Wirbeltieren im Magen. Nach anatomischen Gegebenheiten lassen sich mehr Zellen im Fundus als im Pylorus nachweisen [71, 85]. Mittels in situ Hybridisierung und immunhistochemischen Untersuchungen ließen sich vier verschiedene Arten ghrelinhaltiger Zellen in der Magenmukosa nachweisen: ECL-, D-, Enterochromaffine und X/A-like-Zellen. Das relative Vorkommen dieser Zellen in den „Magendrüssen“ beim Menschen beträgt etwa 30% ECL-Zellen, 22% D-Zellen, 20% X/A-like-Zellen und 7% EC-Zellen. Weitere immunoreaktive Ghrelinzellen werden in Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon nachgewiesen [71].

Da der Ghrelin-Rezeptor GHS-R hauptsächlich im Hypothalamus und in der Hypophyse produziert wird, wird sein endogener Ligand vornehmlich im Hypothalamus angenommen. Diese Annahme wurde durch den Nachweis eines anderen GH-freisetzenden Peptids, dem GHRH bestärkt, das im Hypothalamus hergestellt und über das Pfortadersystem der Hypophyse eine GH-Freisetzung aus somatotropen Hypophysenzellen bewirkt. Jedoch ist das quantitative Vorkommen von Ghrelin im Gehirn von geringer Relevanz [18, 127]. Weitere Gewebe, in denen Ghrelin nachgewiesen werden konnte, sind Nierenglomeruli, Zytotrophoblasten und Syncytiotrophoblasten, Leydig-Zellen und Sertoli-Zellen.

1.7. Beziehung Ghrelin – Herz

1.7.1. in vitro - Studien zur Ghrelinexpression von Kardiomyozyten und dem Ghrelinrezeptor

Auf Grund der Eigenschaften von Ghrelin, die myokardiale Kontraktilität zu fördern, vasodilatatorisch zu wirken und vor myokardinfarkt-induziertem Herzversagen zu schützen, wurden neben dem Magen als Ursprungsort viele andere Gewebe daraufhin untersucht, ob sie Ghrelin erzeugen können. Iglesias et al. prüften, ob Kardiomyozyten selbst Ghrelin synthetisieren und freisetzen und gingen der Frage nach, inwiefern

exogene Faktoren wie Stress oder apoptosefördernde Stoffe die Funktion dieser Zellen beeinträchtigen. Als Untersuchungsmaterial wurden HL-1-Zellen (einer Zelllinie von Vorhofkardiomyozyten adulter Mäuse) und Primärkulturen von adulten menschlichen Kardiomyozyten verwendet. Die Expression wurde mit immunozytochemischen Verfahren, Radioimmunoassays und RT-PCR dargestellt.

Die Untersuchungen ergaben, dass Kardiomyozyten menschlichen und tierischen Ursprungs Ghrelin synthetisieren. HL-1-Zellen sekretieren Ghrelin und exprimieren auch den GHS-Rezeptor, der Ghrelin effizient an die Zelloberfläche binden kann. Menschliches Myokard exprimiert GHS-R1a-mRNA [128].

1.7.2. Der mögliche Einfluss von Ghrelin auf die Progredienz chronischer Herzinsuffizienz

Ghrelin steigert über GH-freisetzende Effekte die Kontraktilität der Kardiomyozyten und wirkt positiv auf die Struktur der Kardiomyozyten [129-132]. GHS-R-mRNA wurde nicht nur in der Hypophyse und dem Hypothalamus nachgewiesen, sondern auch in Herzgewebe und Blutgefäßen [32, 55]. Die Tatsache, dass die Stimulation des GHS-Rezeptors mit einem synthetischen GHS, dem Hexarelin, bei hypophysectomierten Ratten nach Ischämie/Reperfusion zu einer Verminderung des Schadens am Herzen führt [133], ist ein weiterer Hinweis für eine positive Wirkung von Ghrelin auf das kardiovaskuläre System.

Nagaya et al. zeigten 2001, dass die intravenöse Applikation von humanem Ghrelin bei chronisch herzinsuffizienten Patienten eine Senkung des mittleren Blutdrucks ohne signifikante Änderung der Herzfrequenz bewirkt. Ghrelin steigert das Herzzeitvolumen und den Schlagvolumenindex ohne signifikante Erhöhung des mittleren Pulmonalarteriendruckes und des Pulmonalarterienverschlussdrucks (Wedge-Druck). Die Ghrelin-Infusion erhöhte den Serum-Ghrelin-Spiegel fünfzehnfach, das zirkulierende Epinephrin, ACTH, Kortisol und Prolaktin nur in geringem Maße [125]. Dieselbe Forschergruppe untersuchte im gleichen Jahr, ob und wie die Gabe von Ghrelin die linksventrikuläre Pumpfunktion und die kardiale Kachexie bei CHF-Ratten verbessert. Dieser Untersuchungsansatz arbeitete mit einer subkutanen Applikation von Ghrelin und zeigte in Folge eine Verbesserung der LV-Pumpfunktion, der Entwicklung des linksventrikulären Remodelings und der Entwicklung der kardialen Kachexie [61].

Diese Ergebnisse legen die Möglichkeit nahe, durch Ghrelingabe bei CHF-Patienten eine eklatante Besserung bezüglich der kardialen Funktion und somit der Lebensqualität erreichen zu können.

1.7.3. Kachexie

Die Kachexie geht als progressiver Muskelabbau und Verlust von Fettmasse bei Patienten mit chronisch konsumierenden Erkrankungen, wie einer chronischen Herzinsuffizienz, einher und verschlechtert die Prognose der Erkrankung erheblich. In der Literatur gibt es keine einheitliche Definition für „Kachexie“. Einige schwer praktikable Ansätze (z.B. DEXA: dual energy X-ray absorptiometry; dt: Duale Röntgen Absorptiometrie-Methode) konnten sich als Definition nicht durchsetzen. Ein Gewichtsverlust von mehr als 6% des Körpergewichts in einem Zeitraum von sechs Monaten, ungeachtet des Body-Mass-Indexes und nicht durch Ödem-Abnahme bedingt, erscheint praktikabel. Derzeit steht keine kausale Therapie für die Behandlung der kardialen Kachexie zur Verfügung. Anfängliche Versuche, der kardialen Kachexie durch GH-Gabe entgegenzuwirken, scheiterten [134].

Die Entdeckung der GH-Vorstufe Ghrelin knüpfte an dieses Prinzip an, da Ghrelin GH-abhängig und GH-unabhängig der kardialen Kachexie entgegenwirkt: Es hemmt die Aktivität der sympathischen Nervenzellen, steigert Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme, wirkt vasodilatatorisch und antiapoptotisch [64]. Eine Kombination aus Ghrelinwirkung und Appetit-Stimulanzien, physikalischem Training und Nahrungsergänzung als therapeutischer Ansatz wäre denkbar, um den Progress der kardialen Kachexie zu bezwingen. Linksventrikuläre Funktionsstörung und kardiale Kachexie werden oft bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz beobachtet. Ghrelin verbessert die linksventrikuläre Fehlfunktion und vermindert die Entwicklung einer kardialen Kachexie durch GH-abhängige und GH-unabhängige Mechanismen: Hemmung des Sympathikus, Stimulation der Nahrungsaufnahme, Adipositas, Vasodilatation und antiapoptotische Effekte (Abb. 6).

2. FRAGESTELLUNG DER STUDIE

Ziel der Arbeit war es, in einer experimentellen Studie die Modulation von Ghrelin als kardiovaskuläres Hormon und seinem Rezeptor (GHS-R1a) an Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz zu untersuchen.

Wirkmechanismen von Ghrelin, die bei herzinsuffizienten Individuen eine Steigerung der Herzleistung bewirken, konnten bis dato nur im Rahmen tierexperimenteller Studien erhoben werden.

Wir untersuchten die Hypothese, dass bei terminal herzinsuffizienten Patienten eine Hochregulierung der Ghrelinrezeptoren (GHS-R) stattfindet. Diese Up-Regulation entsteht wohl infolge der Herabsetzung der zellulären Expression von Ghrelin selbst. Zur Darstellung der Veränderung von Rezeptordichte und quantitativer Erhöhung von Ghrelin bei terminaler Herzinsuffizienz wurden immunohistochemische Nachweisverfahren und RT-PCR angewandt. Diese Verfahren ermöglichen einen quantitativen und qualitativen Nachweis der Rezeptordichte für Ghrelin und für die lokale Ghrelinexpression.

Dabei sollten folgende Hypothesen geklärt werden:

- Untersuchung der Expression/Modulation des Ghrelinpeptids und des Ghrelinrezeptors GHS-R1 in herzinsuffizientem menschlichem Myokard im Vergleich zu nicht-erkranktem Myokard.
- Untersuchung des Unterschieds in der Expression von Ghrelin/des Rezeptors in Abhängigkeit der anatomischen Areale.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Demographie Studiengruppe/Patienten

Wir untersuchten erkranktes Herzmuskelgewebe von 12 Patienten, die sich im Zeitraum von August 2008 bis Januar 2009 einer Herztransplantation an unserem Zentrum, der Herzchirurgischen Klinik, Klinikum Großhadern in München, unterzogen hatten. Die chirurgische Komponente aller Transplantationen war erfolgreich. Es wurden insgesamt 48 Biopsien von 12 Patienten (n=12) an standardisierten anatomischen Stellen unter sterilen Kautelen entnommen (Abb. 7 [135]). Die Entnahme erfolgte unmittelbar nach der Explantation des erkrankten Herzens: pro Patient wurde jeweils eine Probe pro rechtem und linken Vorhof sowie aus dem rechten und linken Ventrikel entnommen.

Zum Nachweis von Ghrelin und GHS-R mittels PCR und immunhistochemischer Färbemethoden wurden die Myokardproben entsprechend vorbereitet.

Die immunhistochemische Aufarbeitung aller Gewebeproben sowie die RT-PCR-Untersuchungen wurden in freundlicher Kooperation mit dem pathologischen Institut der Universität Compostela di Santiago, Spanien, von Herrn Professor Andres Beiras-Iglesias durchgeführt.

Alle Patienten litten an chronischer Herzinsuffizienz, bedingt durch dilatative und ischämische Kardiomyopathien unterschiedlicher Genese. Alle Patienten willigten in die Verwendung des entnommenen Materials schriftlich ein. Die demographischen Daten sind in Tabelle 6 dargestellt.

	Studiengruppe (n=12)	Kontrollgruppe (n=3)	p-Wert
Alter (Jahre)	43,6 ± 15,8	32,5 ± 5	nicht signifikant ^e
Größe (Meter)	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,3	nicht signifikant
Gewicht (Kilogramm)	72,6 ± 22,2	74,2 ± 12,5	nicht signifikant
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion (%)	21,6 ± 7	keine Angabe ^f	
Wartezeit Transplantationsliste (Tage)	164,9 ± 301,1	keine	
LV ^a -Hypertrophie	7	keine Angabe	
CAD ^b (n)	5	keine Diagnose ^g	
PCWP ^c (mmHg)	25,5 ± 5,4	keine Angabe	
pulmonale Hypertension	8	keine Angabe	
Niereninsuffizienz	7	0	< 0,05
β – Blocker	9	0	< 0,05
ACE ^d – Hemmer (n)	9	0	< 0,05
Statine (n)	4	0	< 0,05

a linker Ventrikel
b koronare Herzerkrankung
c Pulmonal-kapillärer Verschlussdruck (PCWP)
d Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmer (=ACE-Hemmer)
e nicht signifikant
f keine Angabe (= nicht gemessen, alle Individuen Kontrollgruppen waren anamnestisch gesund, sportlich und ohne Anzeichen von Herzerkrankungen)
g nicht bekannt

Tabelle 6: Kollektiv Studiengruppe demographische Daten

3.2. Demographie der Kontrollgruppe

Aus ethischer Sicht war die Erstellung einer Kontrollgruppe gesunder Patienten nicht möglich.

Somit konzipierten wir eine Kontrollgruppe aus kommerziell erworbenen Proben von Herzmuskelgewebe analog zu den Arealen der Studiengruppe und Myokard, das bei Autopsien entnommen worden war. Alle Patienten, bei denen im Rahmen einer Autopsie Biopsien entnommen worden waren, waren an nicht kardialen Ursachen verstorben, entweder an den Folgen eines Verkehrsunfalls oder an isoliertem Schädel-Hirn-Traumata (Kontrollgruppe: nicht-erkrankte Myokardgewebeproben).

3.2.1. Autopsien

Die Entnahme der Biopsien bei den Autopsien wurde am Institut für Pathologie der Universität von Santiago de Compostela durchgeführt.

Es bestand weder histologisch noch makroskopisch der Hinweis auf das Vorliegen einer kardialen oder kardiovaskulären Erkrankung. Kein Patient litt unter Adipositas, das Patientenalter betrug im Durchschnitt $28,3 \pm 2,9$ Jahre.

In die Kontrollgruppe sind drei Patienten (n=3) eingeschlossen, denen ebenfalls jeweils vier Biopsien an definierten anatomischen Stellen entnommen wurden. Alle Autopsien wurden im Zeitraum von 12 bis 16 Stunden postmortal unter sterilen Kautelen durchgeführt.

3.2.2. Kommerziell erworbene Myokard-RNA der Kontrollgruppe

Um eine vergleichbare Anzahl der Myokardbiopsien in der Kontrollgruppe gegenüber der Studiengruppe zu erhalten, haben wir unsere Kontrollgruppe durch zwei Samples kommerziell erworbener Myokard-RNA von Ambion and Biochain®, Hayward, CA, USA, erweitert. Laut Produktbeschreibung des Herstellers [136] wurde die Gesamt-RNA durch modifizierte Guanidin-Thiocyanat-Techniken isoliert und in einem RNA-Puffer konserviert. Die Samples stammten ebenfalls von herzgesunden Individuen. Die Proben wurden zum Nachweis der Genexpression mit RNAlater® (Ambion, Austin, Texas, USA) vorbereitet und entsprechend des Studienprotokolls analog zu unseren anderen Untersuchungen verarbeitet.

3.3. Gewebeproben

3.3.1. Beschreibung der Entnahme des insuffizienten Gewebes

Die Gewebeproben stammen von Patienten unseres Zentrums, die sich im Stadium der terminalen Herzinsuffizienz einer Herztransplantation unterzogen. Entnommen wurden die Biopsien unverzüglich während des kardiochirurgischen Eingriffs, sobald das erkrankte Organ entnommen war. Dabei wurden unter sterilen Bedingungen ca. 1x1 cm große Gewebestücke an bestimmten anatomischen Stellen des rechten und linken Ventrikels und des rechten und linken Vorhofs entnommen (Abb. 7). Das Postulat, die gesamten Wandschichten (Endo-, Myo- und Epikard) zu erhalten, wurde erfüllt. Unmittelbar nach Entnahme wurde die Hälfte des gesamten Materials in RNAlater-Lösung® (Ambion, Austin, Texas, USA) bis zu unserer Verarbeitung konserviert. Die andere Hälfte der Biopsien wurde für weitere histologische und immunohistochemische Analysen in 4% Formaldehyd fixiert.

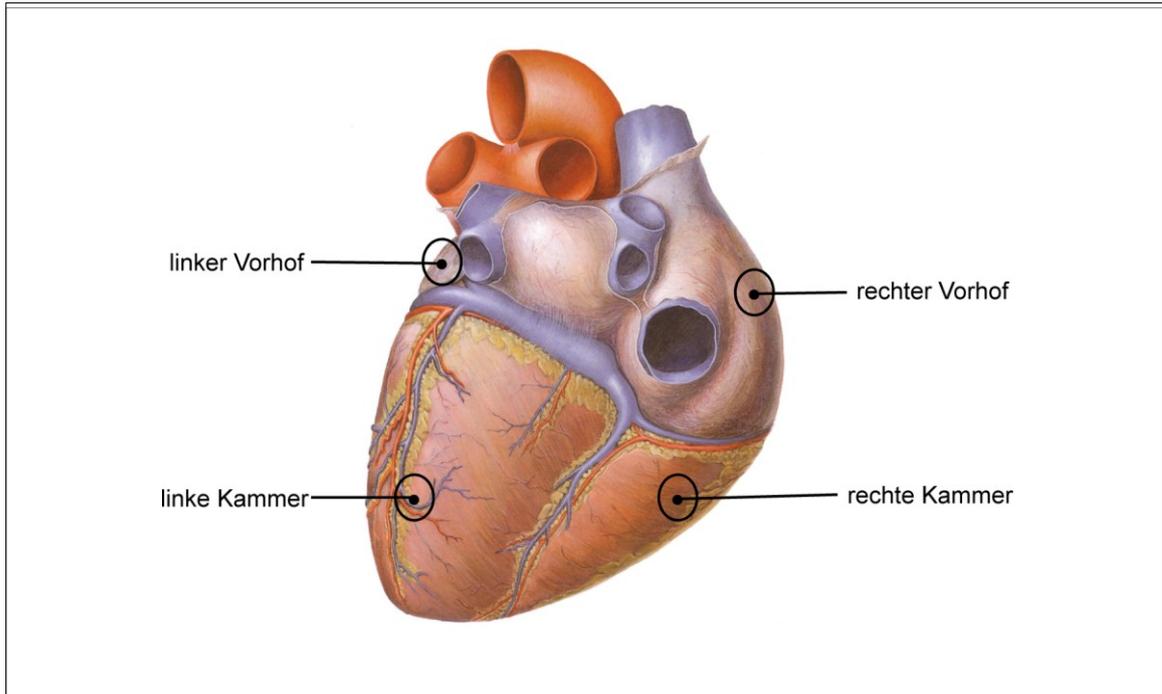


Abbildung 7: Anatomische Entnahmestellen der Gewebeproben (Modifizierte Darstellung aus Sobotta, Anatomieatlas [135]).

3.3.2. Ghrelin-mRNA-Amplifikation mit RT-PCR

Zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der Mengenverhältnisse von Ghrelin und seinem Rezeptor mittels RT-PCR musste aus dem gewonnenen Material die RNA extrahiert werden. Die Extraktion der gesamten RNA der Gewebeproben wurde unter Verwendung von Trizol® (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA) unter Einhaltung der Herstellerangaben durchgeführt. Für den Nachweis der Expression der Ghrelin mRNA wurden spezifische Primer (Tab. 7) verwendet, optimiert für den semi-quantitativen Nachweis.

Die Ergebnisse wurden durch interne Kontrollen geprüft, indem parallel zu jeder mRNA-Amplifikation jeweils ein Sample mit einem HPRT-Primer (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) durchgeführt wurde. Aus der erhaltenen RNA wurde die kontempläre DNA unter Verwendung folgender Ingredienzien erzeugt:

1nM eines randomisierten Primers, 200 U M₀ML Superscript II Reverse Transkriptase und 20 U Ribonuklease Inhibitor in einem Gesamtvolumen von 30µl (Invitrogen™).

Zur Amplifikation der verschiedenen Gene wurden spezielle Primer gewählt, die die Amplifikation von nicht-spezifischer DNA verhindern. Die Inkubation der RT-PCR Reaktionen wurde für eine Stunde bei 37°C und 42°C für 10 Minuten gestartet und durch Erhitzen auf 95°C für eine Dauer von 5 Minuten beendet.

Die somit generierte cDNA wurde durch Zugabe von 50 µl 1xPCR-Puffer und darin enthaltenen 1,25 U Taq-DNA Polymerasen (Invitrogen™) und 1 nM aus *forward* und *reverse* Primern vervielfältigt.

Das humane Ghrelin wurde nach folgendem Journal amplifiziert:

Denaturierung bei 95°C für eine Minute, Annealing (Primerhybridisierung) bei 62°C für 30 Sekunden und Amplifikation in 34 Zyklen bei 72°C für jeweils eine Minute. Die Ergebnisse der RT-PCR wurden durch DNA-Sequenzierung, einem Verfahren zur Bestimmung der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül, abgesichert. Zur Erfüllung des internen Qualitätsanspruches wurde HPRT cDNA amplifiziert.

Die durch PCR erzeugten Produkte wurden elektrophoretisch auf einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und visuell durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht dargestellt (Gel Doc 1000 Documentation System; Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA).

Kontrollen ohne Material oder Reaktionspartner (liquid controls) und Reaktionen ohne RT führten bei allen Proben zu keiner Amplifizierung.

Primer	Sequenz	Universal Probe Library
Ghrelin (forward primer)	5'-GGGGAAGTTTCTTCAGGACA-3'	probe: #57
Ghrelin (reverse primer)	5'-CTTGTGGGCGATCACTTGT-3'	probe: #57
GHSR-1a (forward primer)	5'-TGTTCAGACTTCTGGGATTCG-3'	probe: #7
GHSR-1a (reverse primer)	5'-GCCCGAGAACTTTCATCTTTC-3'	probe: #7
GAPDH (forward primer)	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	probe: #60
GAPDH (reverse primer)	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	probe: #60
B2M (forward primer)	5'-TTCTGGCCTGGAGGCTATC-3'	probe: # 42
B2M (reverse primer)	5'-TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC-3'	probe: # 42

Tabelle 7: Verwendete Primer für die semi-quantitative RT-PCR.

3.3.3. Der immunhistochemische Nachweis der Ghrelin-Expression

Die immunhistochemische Untersuchung der Kontroll- und Studiengruppe, wurde in Anlehnung an das Immunhistochemieprotokoll von Raghay und Mitarbeitern 2008 [137] angefertigt.

Die Konservierung der gesamten Myokardproben (n=48) der Studiengruppe erfolgte nach einem Standardverfahren in 4%ig gepuffertem Formalin für 24 Stunden. Die Proben wurden konserviert, dehydriert und in Paraffin eingebettet. Das Vorgehen der Verarbeitung der Proben der Kontrollgruppe wurde analog zur Verarbeitung der Proben der Studiengruppe durchgeführt. Die paraffinierten Myokardblöcke wurden in 4µm dicke Scheiben geschnitten und mit Histobond Adhesion Microslides® (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) verbunden dann wurde die Paraffinschicht entfernt. Das Antigenretrieval wurde mit einem 10 mM Natriumcitratpuffer (pH 6,0) durch Erhitzen in einem Mikrowellenofen für 20 Minuten bei 750 Watt ausgerichtet.

Alle Proben wurden auf folgende Weise in mehreren Zyklen inkubiert:

(1)

Die Proben wurden in einer Verdünnung von 1:500 mit dem polyklonalen Kaninchen Primärantikörper (polyklonaler Kaninchen-Anti-Ghrelin Antikörper 3-7 freundlicherweise von Dr. Kojima zur Verfügung gestellt) für 60 Minuten inkubiert, um das Ghrelin-Peptid nachzuweisen. Zum Nachweis des Proteins GHS-R1a wurde als Primärantikörper ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper, verdünnt 1:100, verwendet. Dieser Antikörper wurde entsprechend dem C-terminalen Fragment (RAWTESSINTC) des menschlichen GHS-R1a-Proteins hergestellt und mit einem Diphtherie-Toxin konjugiert (Mimotopes; Melbourne, Australia), wie im Detail von Jeffery et al. beschrieben [106].

Zwischen allen folgenden Schritte wurden die Schnitte mehrmals mit TBS (50mM Tris Puffer, pH 7,6, mit 150mM NaCl) für 5 Minuten gespült.

(2)

Als Sekundärantikörper wurde ein gegen Kaninchen-IgG gerichteter Ziegen-Antikörper von Envision, DakoCytomation verwendet und darin für 30 Minuten gelöst.“

(3)

Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurden die Schnitte für einen Zeitraum von 10 Minuten in 3%iges Wasserstoffperoxid getaucht.

(4)

Als Chromogen wurde 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Lösung (DAB) (Dako®), nach Herstellervorgaben verwendet, das die exogenen Peroxidasen oxidiert und eine spezifische, positive Farbreaktion (bräunlich-rot) erscheinen lässt.

(5)

Die Reaktion wurde anschließend durch 3-minütiges Spülen mit destilliertem Wasser gestoppt.

Nach Abschluss dieser Schritte wurden die getrockneten Schnitte eingedeckelt.

Die Spezifität der Immunhistochemische Untersuchungen wurde durch positive (n=4) und negative (n=4) Kontrollen in gastralem und neuronalem Gewebe von Ratten durchgeführt. Die positiven Kontrollen wurden analog zu der Studienfärbung gemacht. Die negativen Kontrollen wurden wie folgt durchgeführt:

1) Auslassen jedes essentiellen Schrittes der Immunreaktion.

2) Ersetzen der primären Antikörper in passender Verdünnung durch normales (nicht immunes) Kaninchen- oder Ziegen-Serum (Dako®).

3) Präadsorption des Anti-Ghrelin-Antikörpers an das homologe Antigen (Ghrelin, 10 nmol/ml, Global Peptide Services, Fort Collins, CO) (über Nacht bei 4°C) wie von Gualillo et al. 2001 beschrieben [138].

4) Verwendung eines anderen Anti-Ghrelin Antiserums (4-4) (freundlicherweise von Dr. Hosoda zur Verfügung gestellt), um zum einen die Ergebnisse zu bestätigen und zum anderen die Präadsorption mit heterologem Antigen durchzuführen (Pancreastatin, 10 nmol/ml, Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA, USA).

Die positiven Kontrollen wurden analog zur oben genannten immunhistochemischen Untersuchung in Anlehnung an Raghay und Mitarbeitern 2008 [137] angefertigt. Zum Gelingen des positiven Nachweises wurde gastrales und neuronales Gewebe von Ratten in den o.g. Zyklen 1-5 nachgewiesen.

Die Analyse der Proben wurde von zwei unabhängigen und erfahrenen Untersuchern kontrolliert.

3.3.4. RNA-Extraktion und reverse Transkriptase

Die RNA aller Gewebeproben wurde mit einer Kombination aus TRIzol® (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) und dem RNaequeous Micro Kit® (Ambion®, Austin, Texas, USA) extrahiert. Im Anschluss folgte die Bearbeitung mit DNase (TURBO DNase™, Ambion®) laut Herstellervorgaben. Anhand eines Spektrometers wurde die Qualität der gewonnenen RNA ermittelt: Sie war in allen Fällen verwendbar (260/280 nm Absorptionsquotient zwischen 1.95 und 2.15). Die mengenmäßige RNA-Ausbeute pro Gewebeprobe lag im Mittel bei 2 µg. Im Anschluss daran wurden die erzeugten RNA-Proben (1000ng) mit reverser Transkriptase in cDNA (complementary DNA, deutsch: komplementäre DNA) umgeschrieben. Zur dafür notwendigen RT-PCR-Reaktion wurde eine Kombination aus Oligo-dT-, Randomprimern und Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen™, Carlsbad, USA) laut Herstellervorgabe verwendet.

3.3.5. RT-PCR

Die Amplifikation der DNA-Transkripte wurde in dreifacher Ausführung mit einem RT-PCR-Gerät, Light Cycler 480 (Roche© Diagnostics, Mannheim, Germany) und dem qPCR Mastermix® und höchst spezifischen Universal Probe Library Assays von Roche (Roche© Diagnostics) angefertigt.

Verwendung der Primer siehe Tabelle 7.

Das Durchführungsprotokoll der RT-PCR beinhaltete 45 Zyklen bei 95°C für jeweils 10 Sekunden, bei 60°C für jeweils 30 Sekunden und bei 72°C für jeweils 15 Sekunden. Mithilfe der „Relative Quantification-Software“ von Roche© Diagnostics wurde die Expression der mRNA unter Verwendung eines effizienz-korrigierten Algorithmus nach dem mathematischen Modell nach Pfaffl [139] mit Standardkurven und Referenzgennormalisierung gegen GADPH und B2M berechnet. Wie bereits von Pérez et al. 2007 beschrieben ist die Verwendung dieser beiden Haushaltsgene als Bezugswert einer verlässlichen qRT-PCR bei Myokardgewebe geeignet [140].

3.4. Techniken

3.4.1. Immunhistochemie

3.4.1.1. Theorie der Immunhistochemie

Immunohistochemische Färbemethoden ermöglichen die Identifikation und den Nachweis von antigenen Strukturen (Epitope) von Zellen und Gewebeteilen durch spezifische Antikörper.

Ein Gewebeabschnitt wird in eine Lösung eingebracht, in der sich ein Antikörper befindet, der gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist. Durch die Antikörper-Antigen-Reaktion bilden sich Antikörper-Antigen-Komplexe, die durch unterschiedliche Techniken sichtbar gemacht werden. Zum Nachweis werden nur spezifische Antikörper verwendet, die meist durch Isotope, Fluoreszenzfarbstoffe oder Enzyme, markiert sind. Wesentlich für die Qualität der Untersuchungsmethoden ist zum einen die Spezifität der verwendeten Antikörper für das zu untersuchende Antigen, zum anderen die Stabilität des nachzuweisenden antigenen Materials. Die Stabilität ist von der chemischen Struktur des Antigens und von der gewissenhaften Vorbereitung des Schnittpräparats (Fixierung, Einbettmedium, Färbeprotokoll) abhängig.

Standardmäßig haben sich zwei Verfahren etabliert: die Verwendung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern. Polyklonale Antikörper binden an verschiedenen Epitopen eines Antigens. Dadurch werden die Sensitivität und die Reaktivität der Färbung erhöht. Der Nachteil dieser Methode sind häufiger falsch positive Ergebnisse durch Kreuzreaktionen mit ähnlichen antigenen Determinanten. Bei monoklonalen Antikörpern führt die Reaktion mit einem spezifischen Epitop auf dem Antigen zu einer hohen Antigen-Spezifität. Veränderungen von Antigen-determinanten, beispielsweise durch Strukturveränderungen während der Präparation, setzen die Spezifität herab und führen somit häufig zu falsch negativen Ergebnissen.

3.4.1.2. Immunhistochemische Färbungen

Alle immunohistochemischen Färbungen führten wir am Institut für Morphologie und Histologie der Universität von Santiago de Compostela, Spanien, unter Anleitung von Professor Andres Beiras Iglesias durch. Die Schnitte wurden für die immunohistochemischen Färbungen (3.3.3-3.3.5) eingearbeitet und in Anlehnung an das Immunhistologieprotokoll von Raghey et al. [137] durchgeführt.

3.4.2. Grundlagen der RT-PCR

Der Begriff „RT-PCR“ ist aus den Abkürzungen der Worte „Reverse Transkription“ (RT) und „Polymerasekettenreaktion“ (PCR) zusammengesetzt und steht für die Durchführung einer PCR-Amplifikation von revers (im Sinne „von hinten“, „rückwärts“) transkribierten RNA-Produkten. Diese Technik kann sehr kleine Mengen RNA (mRNA, rRNA, tRNA usw.) vervielfältigen (Abb. 8).

3.4.2.1. Theorie der RT-PCR

Ziel der RT-PCR-Methode ist es, die Expression eines Gens nachzuweisen. Durch die Verwendung genomischer DNA bei der normalen PCR kann keine Aussage getroffen werden, ob das zu untersuchende Gen tatsächlich exprimiert wird oder nicht. Ausgangspunkt der RT-PCR ist mRNA, und mRNA entsteht nur, wenn das besagte Gen auch wirklich exprimiert wird.

Bei Eukaryoten finden post-transkriptionale Prozesse im Zellkern statt. Diese Prozesse erzeugen eine immature (lat. unreif) RNA, die durch Nukleosporen in das Zytoplasma der Zellen transportiert wird. Diese RNA hat dieselbe Basensequenz wie der Antisense-Strang der DNA - außer, charakteristisch für den Unterschied zwischen RNA und DNA, Einbau von Uracil-Basen anstelle von Thymin-Basen, und Ribonukleose anstelle Desoxyribose. Zudem fehlen gesplicte Introns. Die erzeugte RNA ist somit zum Antisense-DNA-Strang komplementär. Primer können sowohl DNA als auch das RNA-Transkript erkennen und daran binden. Ein geeigneter Primer kann den Anfangspunkt an der mRNA für die Bindung einer Reversen Transkriptase bilden, die komplementär zur mRNA-Sequenz einen DNA-Strang (cDNA) herstellt. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, eine cDNA zu gewinnen, die nur die zu untersuchende Gensequenz enthält, da durch Splicing alle Introns wegfallen. Nach Ablauf der Translation hat man Aminosäuren erhalten. An den Schritt der (c)DNA-Generierung wird zur Amplifikation eine konventionelle PCR angeschlossen, und die zu untersuchende Gensequenz kann stochastisch unendlich vervielfältigt werden. Im Gegensatz zu den anderen gängigen Methoden, mRNA und damit Genexpression nachzuweisen (z.B. Northern Blot), kann bei der RT-PCR mit deutlich weniger Material eine Amplifikation generiert werden, und somit der Nachweis der Expression gelingen.

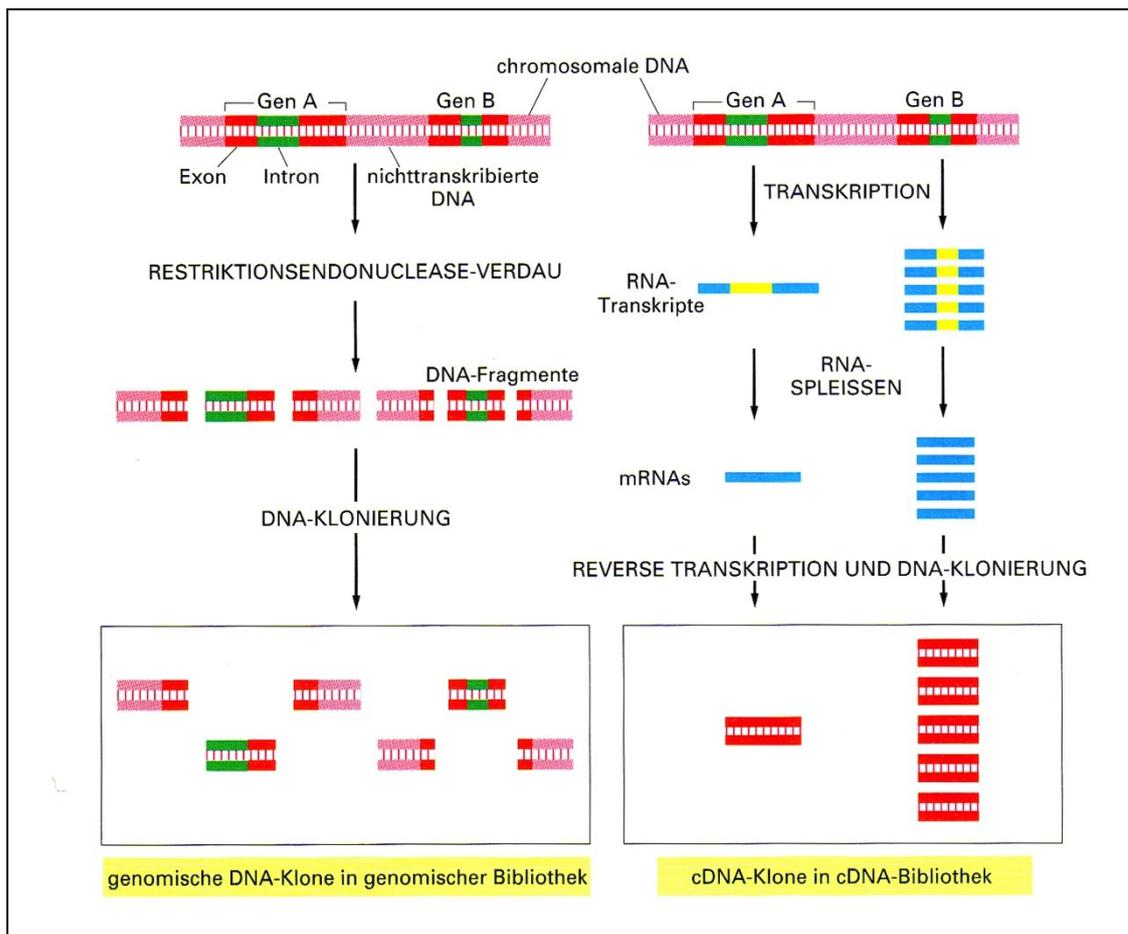


Abbildung 8: Unterschiede zwischen genomischen DNA-Klonen und cDNA-Klonen [141].

Mit Hilfe der bekannten Sequenz des zu amplifizierenden DNA-Stücks werden zwei synthetische DNA-Oligonukleotide erzeugt, die jeweils zu einem Strang der DNA-Doppelhelix an den entgegengesetzten Enden komplementär sind. Diese Oligonukleotide definieren das zu amplifizierende DNA-Segment und dienen als Primer für die in-vitro DNA-Synthese, die von einer DNA-Polymerase durchgeführt wird.

(Abb. 9, A): Die PCR beginnt mit doppelsträngiger DNA; jeder Reaktionszyklus beginnt mit einem kurzen Erhitzen, um die beiden Stränge zu trennen (Schritt 1). Nach der Trennung der Stränge wird die DNA in Gegenwart eines großen Überschusses der beiden Oligonukleotidprimer abgekühlt; dabei können diese an ihre komplementären Sequenzen in den beiden DNA-Strängen hybridisieren (Schritt 2). Die Mischung wird dann mit DNA-Polymerase und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten inkubiert, so dass die DNA-Synthese ausgehend von den Primern erfolgen kann (Schritt 3). Der Zyklus beginnt anschließend wieder von vorne mit Erhitzen, um die neu synthetisierten DNA-Stränge wieder zu trennen. Diese Technik benötigt eine spezielle DNA-

Polymerase, die aus einem thermophilen Bakterium isoliert wird und bei wesentlich höheren Temperaturen stabil ist im Gegensatz zu eukaryontischen DNA-Polymerasen; diese speziellen DNA-Polymerasen werden deshalb bei dem Hitzeschritt (1) nicht denaturiert und müssen nicht nach jedem Zyklus erneut hinzugegeben werden.

(Abb. 9, B): Wird diese Prozedur mehrfach wiederholt, dienen die neu synthetisierten DNA-Fragmente selbst als Matrize, und nach wenigen Zyklen ist die zwischen den Primern erfasste DNA-Sequenz der Ausgangsmatrize die dominierende Sequenz. In der Praxis werden 20 bis 30 Zyklen für eine sinnvolle Amplifizierung durchgeführt. Jeder Zyklus verdoppelt die synthetisierte DNA-Menge des vorhergehenden Zyklus. Die Dauer eines Zyklus beträgt ungefähr fünf Minuten; die Automatisierung der ganzen Prozedur erlaubt die zellfreie Klonisierung eines DNA-Fragments innerhalb weniger Stunden, im Gegensatz dazu müssen für die Standard-Klonisierungstechniken mehrere Tage aufgewendet werden. Von der Ausgangs-DNA wird nur die zwischen den Primern liegende DNA amplifiziert, weil an anderer Stelle keine Primer binden. In dem in (B) gezeigten Beispiel erzeugen drei Reaktionszyklen 16 DNA-Fragmente, von denen acht (gelb eingerahmt) die gleiche Länge haben und exakt der Ausgangssequenz ganz links entsprechen; die anderen Stränge enthalten zusätzliche DNA stromabwärts von der ursprünglichen Sequenz, die in den ersten paar Zyklen repliziert wird. Nach weiteren drei Zyklen sind 240 von 256 DNA-Fragmenten identisch mit der Ausgangssequenz, und nach einigen weiteren Zyklen haben praktisch alle DNA-Fragmente die gleiche Länge [141].

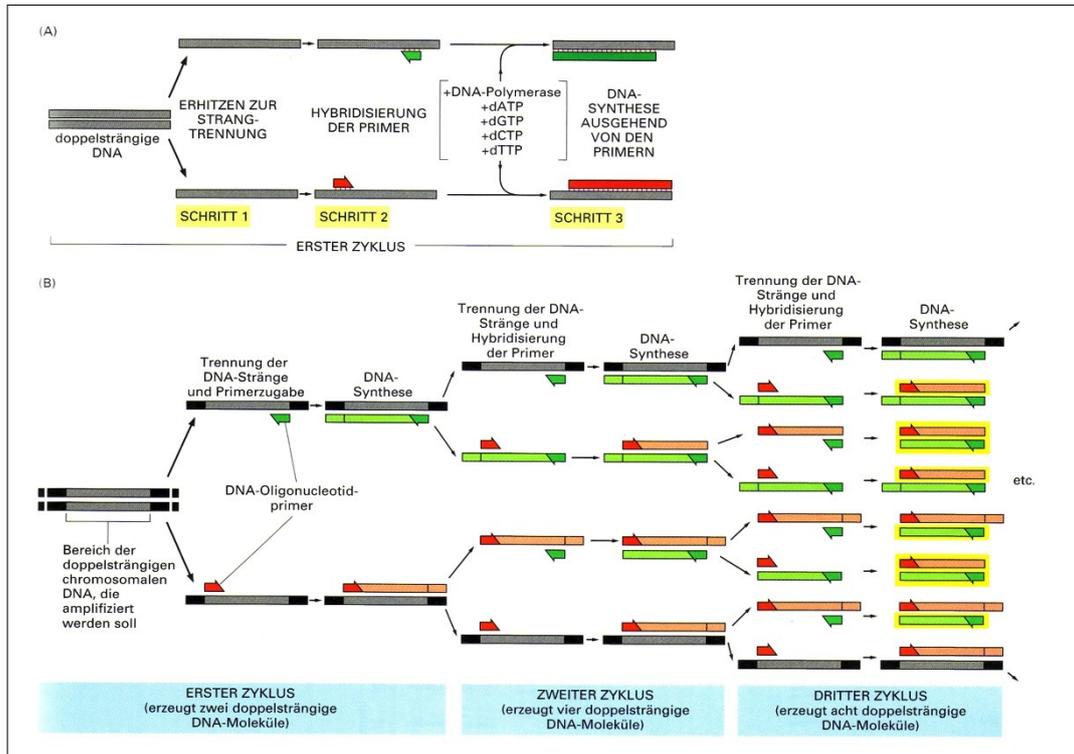


Abbildung 9: Amplifizierung von DNA mit der PCR-Technik, nach abgelaufener RT-PCR [141].

3.5. Statistische Analysen

Alle Werte wurden auf ihre Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest modifiziert und nach Liliefort überprüft. Normal-verteilte konstante Werte zwischen zwei Gruppen wurden unter Verwendung des t-Tests untersucht. Nichtparametrische konstante Daten wurden mit der Monte Carlo Korrektur des Mann-Whitney-U-Tests verglichen.

Die normal-verteilten Daten sind in Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Ein p-Wert < 0.05 kann als statistisch signifikant angenommen werden.

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Statistik-Programm SPSS 17.0 (SPSS®, Chicago, Illinois, USA) ausgeführt.

3.6. Veränderung der Ejektionsfraktion bei insuffizientem Herzen

Der Begriff „Ejektionsfraktion“ (EF) ist eine Messgröße in der Kardiologie und Herzchirurgie, die eine Beurteilung der Herzleistung zulässt. Die EF beschreibt in Prozent das Blutvolumen, das pro Kontraktion vom Herzen ausgeworfen wird – also das Schlagvolumen (SV) im Verhältnis zum Blutvolumen in der Kammer (enddiastolisches Volumen, EDV). Die EF ist bei Vorliegen einer Herzinsuffizienz typischerweise erniedrigt (Normwerte: >55 bis 60%).

$$EF [\%] = \frac{SV}{EDV} = \frac{EDV - ESV}{EDV} \times 100 \quad [142]$$

Formel 1: Berechnung der Ejektionsfraktion, wobei LVEDV das enddiastolische und LVESV das endsystolische Volumen des linken Ventrikels bezeichnet.

Der Quotient aus dem Dividenden (Schlagvolumen = SV) und dem Divisor (enddiastolisches Volumen = EDV) ergibt die EF in Prozent.

Die EF, bestehend aus dem Minuenden (enddiastolisches Volumen = EDV) und dem Subtrahenden (endsystolisches Volumen = ESV) erhöht sich, wenn entweder der Minuend erhöht oder der Subtrahend erniedrigt wird. Eine Erhöhung des Minuenden, der gleichzeitig Divisor ist, bewirkt eine Erhöhung des enddiastolischen Volumens. Dieses Volumen ist typischerweise bei Ventrikeldilatation, also auch bei Vorliegen einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz, erhöht.

Eine Verringerung des endsystolischen Volumens hingegen ruft eine Reduktion des im Ventrikel zurückbleibenden Volumens pro Kontraktion hervor. Dieser Reduktion kann durch Kontraktionssteigerung entgegengewirkt werden, beispielsweise durch die Gabe inotroper Medikamente oder auch Ghrelin.

4. Ergebnisse

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse unserer Studie, die mit o.g. Verfahren eruiert wurden, bezüglich der Modulation des Ghrelinrezeptors und des Ghrelinpeptids bei CHF-Herzmuskelgewebe mit immunhistochemischen Untersuchungsmethoden und RT-PCR dargestellt. Die quantitative und qualitative Aussage der Proteinsynthese erfolgt über die Menge der erhaltenen Transkripte. Dasselbe Verfahren wurde auf die Darstellung der Modulation der Rezeptoren und des Peptids bei der Studien- und Kontrollgruppe angewandt, die erhaltenen Ergebnisse wurden miteinander verglichen. Der Vergleich ergab einen Anstieg der Ghrelin-Rezeptor-Expression bei der Studiengruppe im Vergleich zu den Kontrollen. Reziprok dazu ergab sich gemäß unserer These eine Verringerung der Expression des Ghrelinpeptids bei der Studiengruppe im Vergleich zu den Kontrollen.

4.1. Immunhistochemische Untersuchung – Kontrollgruppe

Zur Quantifizierung und Validierung der RT-PCR-Ergebnisse wurden mehrere immunhistochemische Färbungen in allen untersuchten anatomischen Arealen der Kontrollgruppe durchgeführt.

4.1.1. Darstellung der Verteilung des Ghrelin-Peptids

Die immunhistochemische Färbung der nicht-erkrankten Gewebeschnitte mit Ghrelin-Antikörper zeigt eine gleichmäßige Färbung bei stark positiver Immunreaktion für das Ghrelinpeptid (Abb. 10, A1-D1). Dies steht für eine quantitativ hohe Peptiddichte. Da es sich bei dem untersuchten Gewebe um nicht-herzinsuffizientes Gewebe handelt, wird die Ausprägung als physiologisch angenommen. Es bestehen keine offensichtlichen Unterschiede der Anfärbbarkeit zwischen den unterschiedlichen anatomischen Arealen.

4.1.2. Darstellung der Verteilung des Ghrelin-Rezeptors

Zur Darstellung der Rezeptordichte ergibt sich nach immunhistochemischer Färbung der Gewebeschnitte der Kontrollgruppe mit Anti-Ghrelin-Rezeptor-Antikörper eine gleichmäßig schwach ausgeprägte Anfärbbarkeit des Zytoplasmas.

Die mäßige Anfärbbarkeit entspricht einer geringen Rezeptordichte unter physiologischen Umständen (Abb. 11, A1-D1).

4.1.3. Zusammenfassung der immunohistochemischen Ergebnisse von nicht-erkranktem Gewebe

Die Untersuchungen ergeben bei gesundem Gewebe einen physiologisch „normal hohen“ Anteil des exprimierten Ghrelinpeptids bei „normal niedriger“ Expression des Rezeptors. Die physiologischen Verhältnisse mit den ergebnen Färbegraden werden als Ausgangsbedingung für gesundes Myokard angenommen.

4.2. Immunohistochemische Untersuchungen – Studiengruppe, Herzinsuffizienz

4.2.1. Darstellung der Verteilung des Ghrelin-Peptids

Das Färbeverhalten bei der Studiengruppe verhält sich konträr zu den immunhistochemischen Färbungen der Kontrollen. Abbildung 10, A2-D2, der Studiengruppe zeigt eine Herabsetzung der Rezeptordichte des Ghrelin-Peptids gegenüber den physiologischen Bedingungen. Es besteht ein gleichmäßig geringer Färbegrad des Zytoplasmas mit Anti-Ghrelin-Antikörper.

4.2.2. Darstellung der Verteilung des Ghrelin-Rezeptors

Das herzinsuffiziente Myokardgewebe zeigt nach immunhistochemischer Färbung mit Anti-Ghrelin-Antikörper eine stark positive Reaktion, für das eine verstärkte Transkription des Ghrelin-Rezeptors spricht. Zwischen den anatomischen Arealen bestehen keine prägnanten Unterschiede der Anfärbarkeit (Abb. 11, A2-D2).

4.2.3. Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse unter pathophysiologischen Bedingungen

Die geringere Anfärbarkeit lässt proportional bei erhöhter Anfärbarkeit des Rezeptors (GHS-R) auf eine quantitative Verringerung des Ghrelinpeptids schließen.

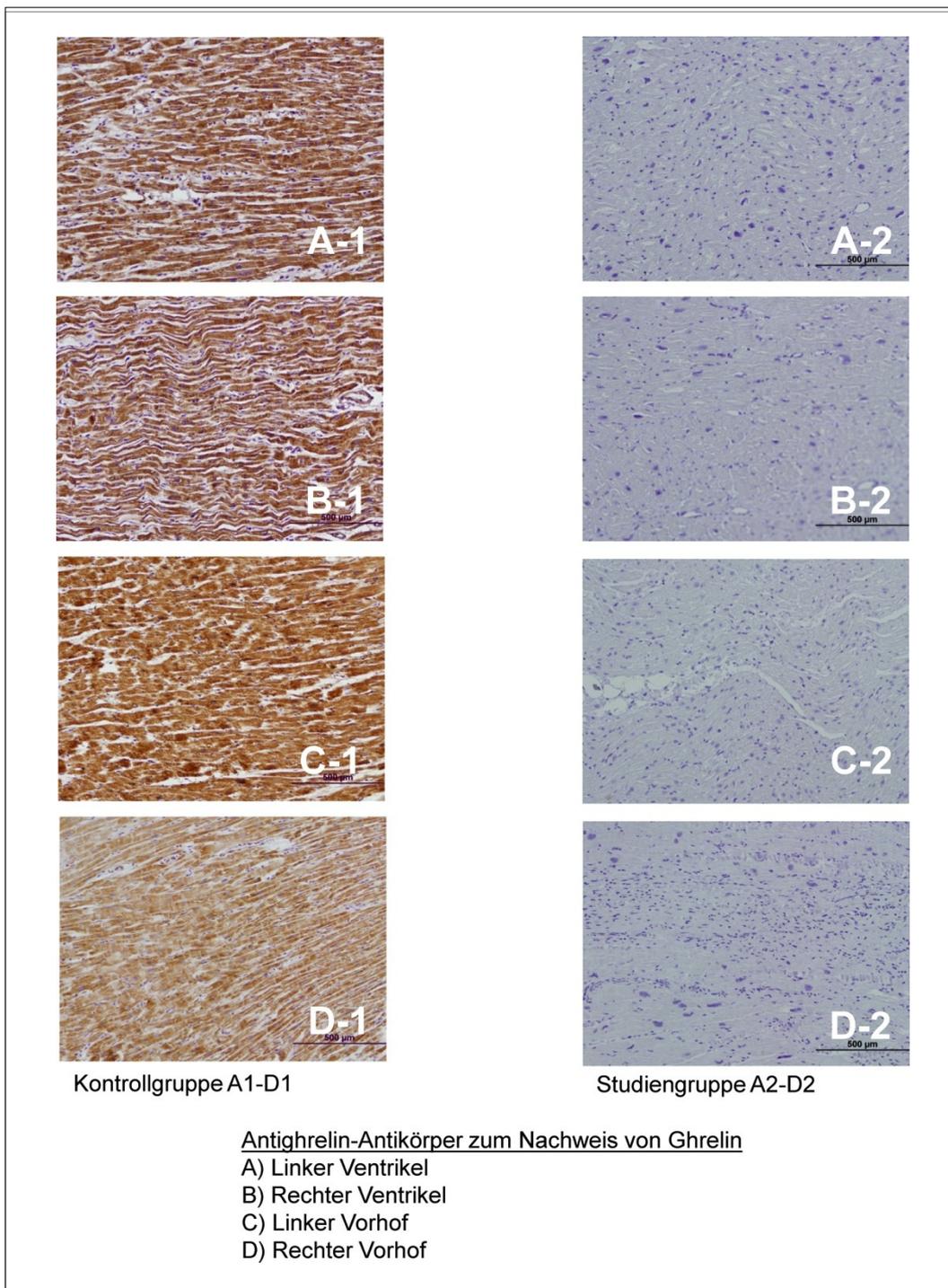


Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis des Ghrelinpeptids in verschiedenen anatomischen Arealen, A1-D1: Kontrollgruppe, A2-D2: Studiengruppe.

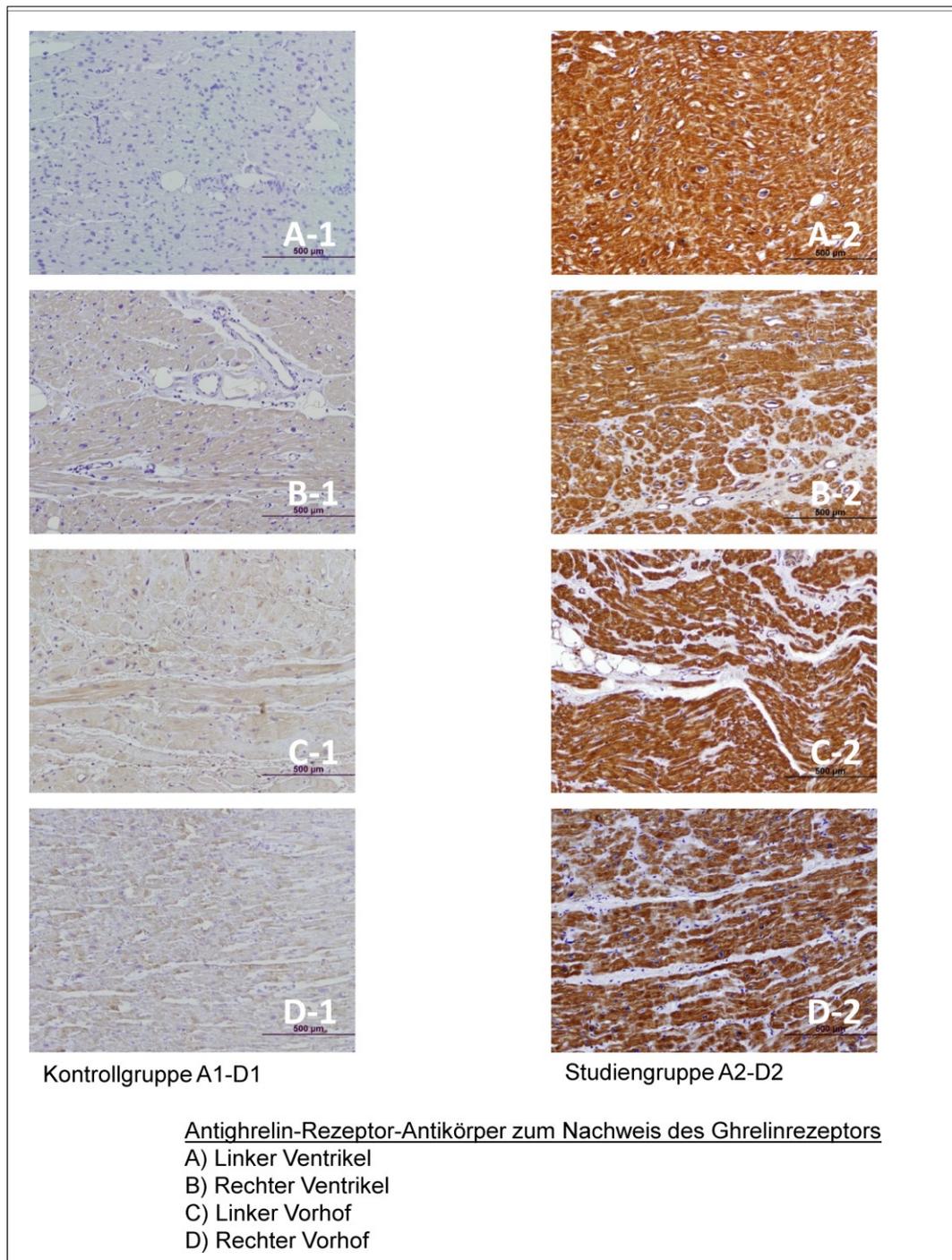


Abbildung 11: Immunhistochemischer Nachweis des Ghrelinrezeptors in verschiedenen anatomischen Arealen, A1-D1: Kontrollgruppe, A2-D2: Studiengruppe.



Abbildung 12: Positivkontrollen des Ghrelinrezeptors und des Ghrelinpeptids in gastralem und neuronalem Gewebe der Ratte, Immunhistochemie.

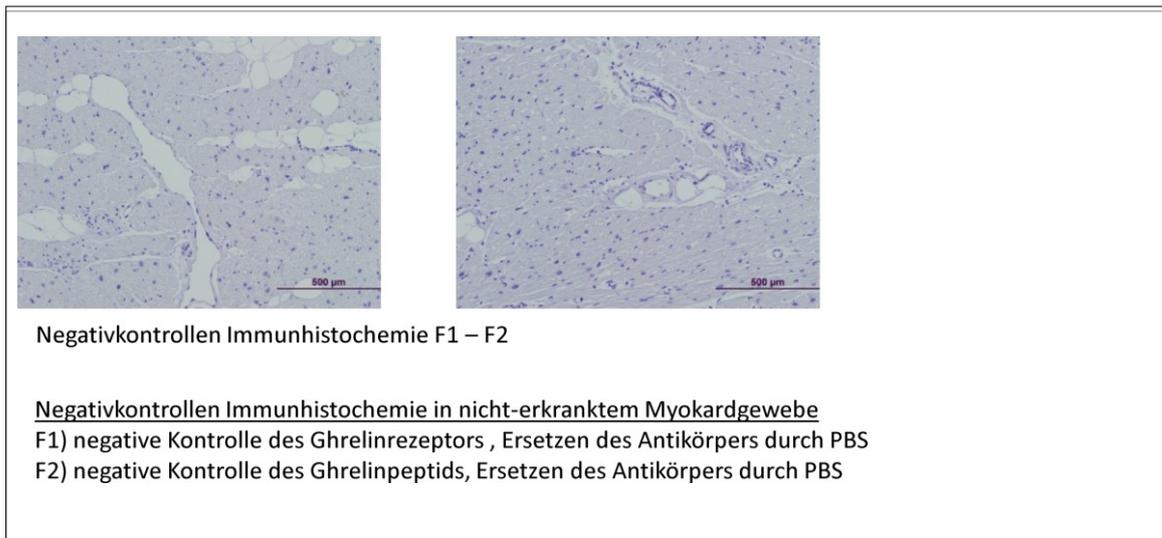


Abbildung 13: Negativkontrolle des Ghrelinrezeptors und des Ghrelinpeptids in nicht-erkranktem Myokardgewebe durch Ersetzen des Antikörpers durch PBS, Immunhistochemie.

4.3. Quantifizierende Untersuchungen, RT-PCR – Kontroll- vs. Studiengruppe

4.3.1. Nachweis der Ghrelin-mRNA

Die RT-PCR Untersuchungen konnten keine signifikanten Veränderungen der Ghrelintranskripte zeigen. Die Untersuchung der Modulation der Ghrelin-mRNA-Expression wurde mittels RT-PCR durchgeführt und in Abbildung 12 graphisch als Balkendiagramm dargestellt. Die Höhe der Säulen des Balkendiagramms stellt die quantitative Transkription der Ghrelin-mRNA-Expression der Kontrollgruppe und der Studiengruppe dar.

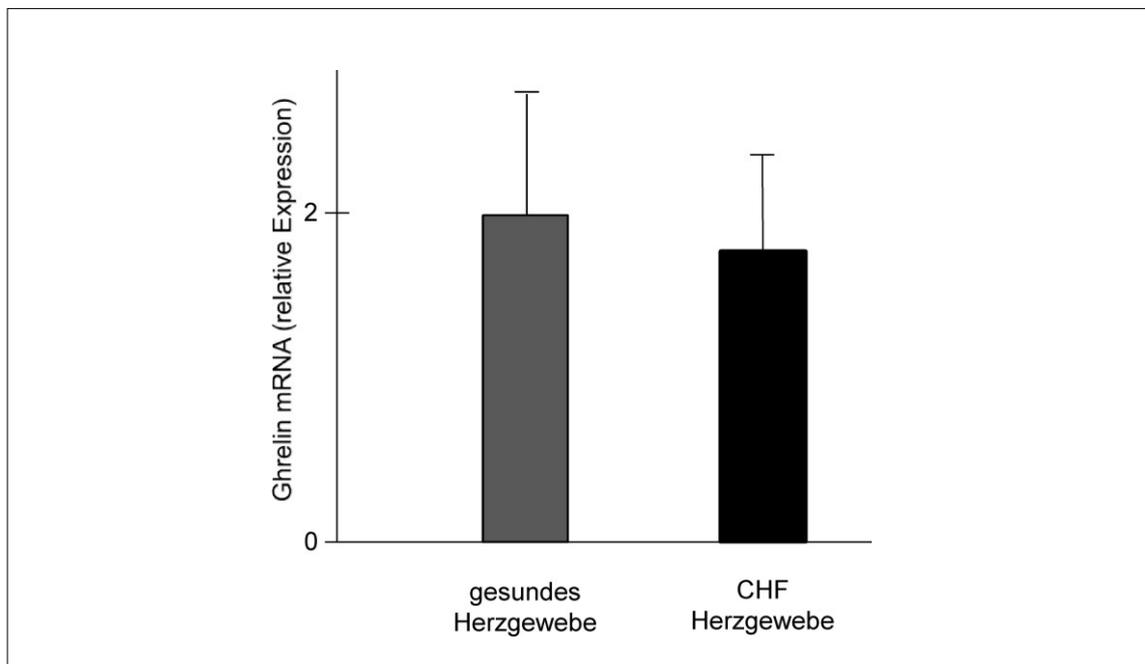


Abbildung 14: Nicht signifikant reduzierte Ghrelin mRNA-Expression in Myokardgewebe von CHF Patienten im Vergleich zu herzgesunden Versuchspersonen. Die RNA wurde aus Myokardgewebe aufbereitet und mittels quantitativer RT-PCR dargestellt (in dreifacher Ausfertigung). Graphik modifiziert nach A. Beiras-Fernandez [143].

4.3.2. Nachweis der Ghrelin-Rezeptor-mRNA

Die Modulation der GHS-Rezeptor-mRNA mittels RT-PCR belegt eine Progression der Rezeptorexpression unter pathophysiologischen Bedingungen.

In Abbildung 15 (siehe Seite 46) zeigt sich eine zehnfach höhere Transkription ($p < 0,05$) der GHS-R-mRNA der Studiengruppe ($12 \pm 3,5$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0,8 \pm 1,2$).

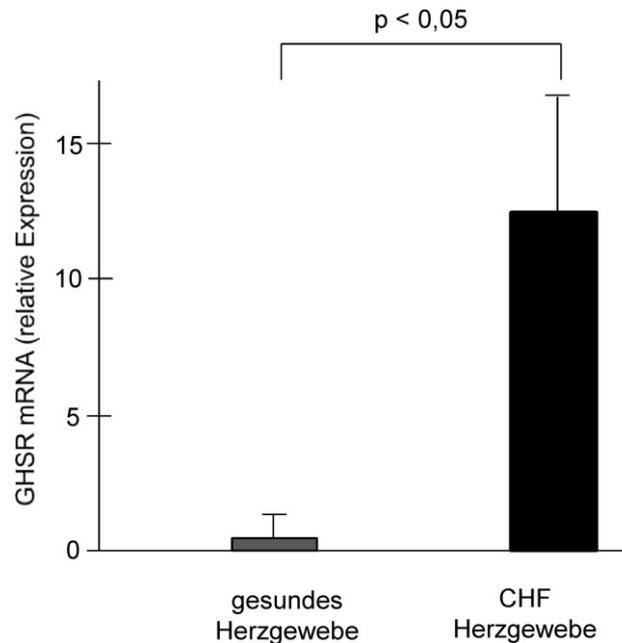


Abbildung 15: Ghrelin-Rezeptor mRNA in Myokardgewebe von CHF Patienten im Vergleich zu herzgesunden Versuchspersonen. Die RNA wurde aus Myokardgewebe aufbereitet und mittels quantitativer RT-PCR dargestellt (in dreifacher Ausfertigung). Die Daten wurden bezüglich GAPDH und B2M-mRNA mit einem effizienz-korrigierten Algorithmus berechnet. CHF (n=12) versus gesundes Myokard (n=5), Mittelwert \pm SEM. Die statistische Signifikanz wurde mit der Verwendung des Mann-Whitney U-Tests durch die Monte-Carlo-Korrekturformel für kleine Probenanzahlen bestimmt. Graphik modifiziert nach A. Beiras-Fernandez [143].

4.3.3. Immunohistochemische Darstellung der Ghrelinexpression

Zur Quantifizierung und Validierung der RT-PCR-Ergebnisse der Expression von Ghrelin in insuffizientem Herzgewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden immunohistochemische Färbungen durchgeführt. Die GRH-Expression drückt sich in der Intensität des Färbegrades aus. Bei einem Skalenbereich von 0 bis 10 wird einer hohen Expression der Wert 10 zugeordnet, einer ausbleibenden Expression der Wert 0. Bei der Beurteilung der Intensität der Färbegrade gibt es keine Signifikanz.

Die Darstellung zeigt eine starke Transkription der Kontrollgruppe (Färbegrad 8) und eine geringere Transkription der Studiengruppe in den verschiedenen Arealen (Färbegrad 1) für Ghrelin.

Die Transkription des Rezeptors verhält sich dazu reziprok (Färbegrad 2 für die Kontrolle des Rezeptors zu Färbegrad 3-6 für die Studiengruppe des Rezeptors).

Die Expression des Ghrelinpeptids zeigt bei der Studiengruppe ($0,5 \pm 1$) sowohl in den Vorhöfen und Ventrikeln, im Vergleich zur Kontrollgruppe ($7,5 \pm 0,5$) eine signifikante Verringerung ($p < 0,05$) (Abb. 14).

4.3.4. Immunohistochemische Darstellung der Ghrelinrezeptorexpression

Bei der Untersuchung des Ghrelin-Rezeptors zeigte sich eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) in der Studiengruppe ($4,5 \pm 2,5$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($1,5 \pm 0,5$) ohne signifikante Unterschiede zwischen den anatomischen Arealen (Abb. 14).

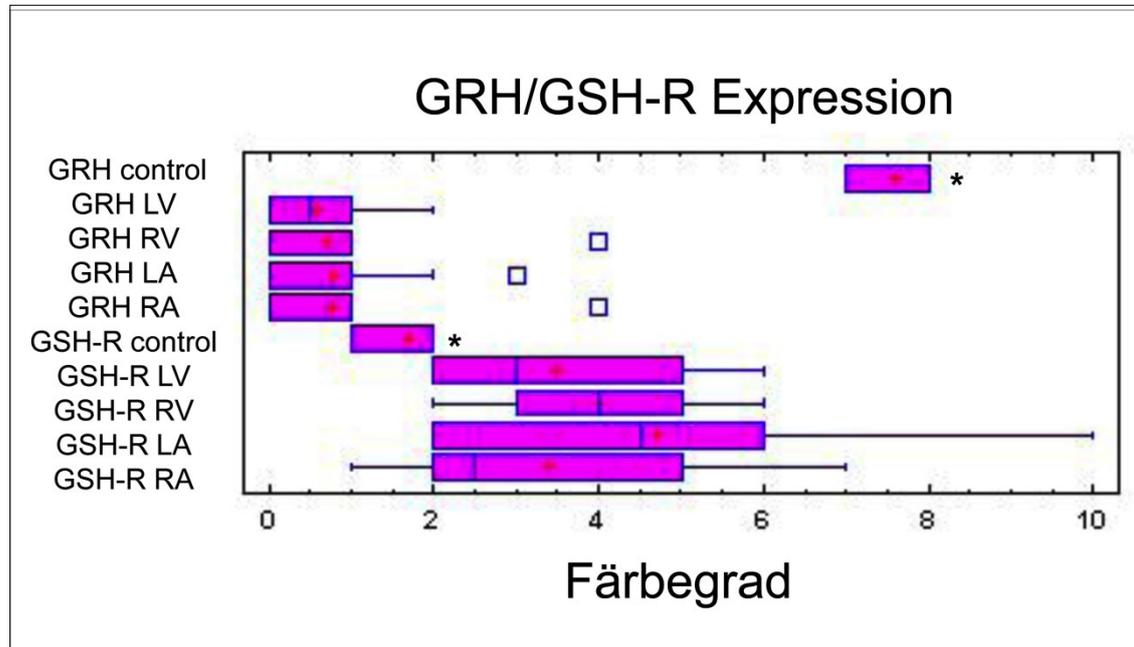


Abbildung 16: Immunohistochemische Darstellung der Expression des Ghrelin-Peptids und des GSH-R im Vergleich zu den Kontrollen.

4.4. Zusammenfassung

Der positive Effekt von Ghrelin auf das kardiovaskuläre System von Ghrelin wurde bereits von einigen Forschungsgruppen untersucht und nachgewiesen [55, 61, 93, 125, 144-147].

In dieser Arbeit wurde speziell die Modulation der Expression des Ghrelinpeptids und des GSH-R (Ghrelin-Secretouge-Hormon-Rezeptor) in herzinsuffizientem Gewebe am Menschen untersucht.

Ähnliche Fragestellungen und Untersuchungen existieren bereits am Tiermodell, bei denen die Auswirkung von exogen verabreichtem Ghrelin unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen auf die Modulation des Ghrelinpeptids und die Expression dessen Rezeptors (GSH-R1) untersucht wird [21, 125]. Nagaya et al. zeigten bereits einen Benefit bei exogen verabreichtem Ghrelin auf die kardiovaskuläre Funktion bei herzgesunden Menschen [20, 52, 55].

Wir bestätigen in dieser Arbeit die Ergebnisse früherer Untersuchungen, die eine Expression von Ghrelin und des GHS-Rezeptors in menschlichem Herzmuskelgewebe belegt haben. Zum ersten Mal jedoch wurde von uns der Beweis geführt, dass in der Expression dieser Proteine zwischen den untersuchten anatomischen Arealen keine Unterschiede bestehen.

Weiterhin haben wir belegt, dass sich die Expression von Ghrelin und seinem Rezeptor bei herzgesundem und herzinsuffizientem Gewebe deutlich unterscheidet. Herzinsuffizientes Gewebe exprimiert geringere Mengen Ghrelin und erhöhte Mengen des GHS-Rezeptors. Dabei bestehen ebenfalls keine prägnanten Unterschiede zwischen den untersuchten anatomischen Arealen.

5. DISKUSSION

Im folgenden Abschnitt wird die Modulation der Expression des Ghrelin-Peptids und des Ghrelin-Rezeptors unter physiologischen Gegebenheiten und terminaler Herzinsuffizienz diskutiert.

Wir haben die These aufgestellt, dass bei vorliegender terminaler Herzinsuffizienz eine gegenläufige Umverteilung der Expression des Ghrelin-Rezeptors und dessen Peptids in Herzmuskelgewebe stattfindet.

Ziel unserer Studie war es, erstmals die pathophysiologischen Veränderungen an menschlichem Gewebe bei terminal herzinsuffizienten Patienten zu untersuchen und eine Modulation der Expression von Ghrelin und seinem Rezeptor nachzuweisen.

5.1. Expression des Ghrelin-Peptids bei CHF-Studien

5.1.1. Expression des Ghrelin-Peptids, CHF menschliche Individuen

Die aktuelle Studienlage belegt, dass Ghrelin und andere synthetische GHS dazu befähigt sind, eine starke und dosisabhängige GH-Ausschüttung zu bewirken. Dieser Effekt kann am Menschen stärker beobachtet werden als im Tierexperiment [18, 31, 35, 67, 68, 75, 76, 148]. Das quantitativ ubiquitäre Auftreten von Ghrelin und dessen Rezeptoren in Vorhöfen, Ventrikeln und Gefäßen erlaubt den Rückschluss, dass Ghrelin Effekte auf das kardiovaskuläre System ausübt [21]. Herzinsuffizienz und andere kardiovaskuläre Erkrankungen führen kompensatorisch zu einer Dichtezunahme der Ghrelin-Rezeptoren [124].

Wir belegen, dass eine Alteration der Rezeptorexpression bei Herzinsuffizienz stattfindet, und dass diese pathophysiologischen Veränderungen zu einer Verringerung der Expression des Ghrelinpeptids führen, was wohl kompensatorisch bedingt ist.

Frühere Untersuchungen zeigen, dass Herzmuskelstammzellen bei Mäusen und Menschen selbst in der Lage sind, mRNA für Ghrelin und den GHS-R zu produzieren. Menschliche Herzmuskelzellen exprimieren den spezifischen Rezeptor GHS-R1a [128]. Somit ist eine Dysregulation der Ghrelin und Ghrelinrezeptorexpression bei Herzinsuffizienz anzunehmen. Unter dieser Annahme ist es möglich, dass die Herzmuskelzellen durch die pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen der Herzinsuffizienz nicht mehr in der Lage sind, selbst Ghrelin zu produzieren.

Aus diesen Gegebenheiten erhoben Beiras-Fernandez et al. 2009 die These, dass bei Vorliegen einer Herzinsuffizienz Kardiomyozyten gegen Ghrelin resistent oder selbst nicht mehr in der Lage sind, Ghrelin zu produzieren [149].

Um die These der Ghrelinresistenz bei vorliegender Herzinsuffizienz zu bekräftigen, werden weitere Untersuchungen zur Evaluation der pathophysiologischen Grundlage notwendig sein.

Nagaya et al. [21] untersuchten in früheren Arbeiten die kardiale Auswirkung von Ghrelingabe bei chronisch herzinsuffizienten Patienten. Die Ergebnisse dieser Arbeiten mit den Ergebnissen unserer Untersuchungen vereint beweisen, dass herzinsuffiziente Patienten von einer Therapie mit Ghrelin profitieren können. Die Untersuchungen zeigten eine Steigerung des Herzindexes (um 25%), eine Steigerung des Stroke-Volume-Indexes (um 30%) und eine Steigerung des Serum-GH um den Faktor 15 ohne wesentliche Steigerung der Herzfrequenz. Der Abfall des MAP ohne Steigerung der Herzfrequenz ließ Nagaya und Mitarbeiter die Theorie aufstellen, Ghrelin habe eventuell selbst eine inotrope Wirkung. Die Validität dieser Annahme konnte durch in-vitro-Versuche mit Ghrelin an Myokardmuskelzellen nicht bestätigt werden. Das Ausbleiben von kontraktilem Ereignissen war für eine direkte inotrope Wirkung nicht aussagekräftig [125]. Ob Ghrelin per se inotrop wirkt oder nicht, wurde in unserer Studie nicht untersucht.

2006 veröffentlichten Nagaya et al. Studien über den positiven Einfluss von Ghrelin auf die linksventrikuläre Herzfunktion, die Übungskapazität und die Reduktion der Apoptose von Herzmuskelzellen bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz [64]. Damit belegt die aktuelle Studienlage eine kardiale Leistungssteigerung durch Erhöhung der Ejektionsfraktion und eine Zunahme der Kontraktilität durch linksventrikulären Muskelmassenzuwachs. Die Abnahme des linksventrikulären enddiastolischen Druckes bzw. Volumens spricht ebenfalls für eine Verbesserung der Herzfunktion bei vorliegender dilatativer Kardiomyopathie.

Für unsere Fragestellung ist die Modulation des Expressionsverhaltens des Ghrelin-Peptids und seines Rezeptors bei physiologischem und pathophysiologischem Gewebe von enormem Interesse. Unsere Ergebnisse zeigen eine signifikante Up-Regulation der Ghrelinrezeptoren bei herzinsuffizientem Myokardgewebe. In Bezug auf unsere These ist es in der Theorie denkbar, dass durch eine Alteration der Ghrelinrezeptoren quantitativ mehr Ghrelin-Moleküle gebunden werden können und infolgedessen über eine höhere GH-Ausschüttung mit einer Steigerung der Herzfunktion zu rechnen ist. Verabreicht man aus therapeutischen Zwecken herzinsuffizienten Individuen bei einer quantitativ erhöhten Ghrelin-Rezeptordichte Ghrelin, kann mit einer Steigerung der Herzleistung gerechnet werden.

Anhand unserer immunohistochemischen Untersuchungen können wir bestätigen, dass das Vorliegen einer schweren Herzinsuffizienz zu einer Reduktion von Ghrelin im

Herzmuskelgewebe führt. Andere Forschergruppen haben in vitro belegt, dass Ghrelin beispielsweise die Apoptose von Herzmuskel- und Endothelzellen inhibiert [90, 96]. Ghrelin stimuliert die ovariale Zellfunktion, indem die Proliferation und Hormonsekretion gesteigert und die Apoptose gehemmt wird [150]. Auch Wang et al. konnten vor nicht allzu langer Zeit die Wirkung von Ghrelinapplikation auf das kardiale System und kardioprotektive Effekte nachweisen. Diese Studie zeigte im Tierversuch ein Entgegenwirken der myokardialen Kalzifizierung, die durch kardiovaskuläre Risikofaktoren entstanden ist [151].

5.1.2. Expression des Ghrelin-Peptids, CHF Tiermodell

In den letzten Jahren sind einige Studien zur Wirkung von GHS auf gesunde und -für unsere Fragestellung relevant- auf kardial erkrankte Individuen durchgeführt worden. Hierbei existiert eine Vielzahl an Studien, die an Säugetieren, zumeist an Ratten [61, 64, 126, 152] erfolgten, da die Aminosäuresequenz von Maus, Ratte und Mensch zu 82,9% übereinstimmen. Der strukturelle Unterschied des Peptids bei Ratte und Mensch besteht lediglich in zwei Aminosäuren [18]. Durch die vorhandenen strukturellen Ähnlichkeiten und dem ähnlichen Genom beider Spezies ist die Erfolgsaussicht auf vergleichbares Expressionsverhalten und vergleichbare Wirkungsweisen zu erwarten.

Nach der Entdeckung von Ghrelin und GHS stieg das Interesse an dem neuartigen Peptid stetig, das neben der Exkretion von GH und anderen regulatorischen Funktionen im Stoffwechsel positive Effekte auf das kardiovaskuläre System ausübt: Positiv inotrope Effekte [153], Vasodilatation [54], kardioprotektive Effekte gegen Ischämie [154], Steigerung der Zellproliferation und antiapoptotische Effekte in-vitro [155]. Diese Eigenschaften scheinen mehr durch die Wirkung von GHS auf die Kardiomyozyten und Gefäße zustande zu kommen, als durch die Wirkung von GH [156] sind Interessante Wechselbeziehungen mit dem kardialen System. 2002 untersuchten Matsumura et al. den kardiovaskulären und sympathischen Effekt bei intravenöser Ghrelingabe. Hierbei verringerte Ghrelin dosisabhängig und signifikant den mittleren arteriellen Druck (MAP) ohne Änderung der Herzfrequenz [144]. Die Behauptung, Ghrelin senke ohne Änderung der HF den MAP, veranlasste die Untersucher dazu, anhand der Muskelverkürzung unter Ghrelineinfluss in-vitro den direkten inotropen Effekt anzunehmen und zu messen [125]. Auch Nagaya et al applizierten in einer weiteren Studie 2003 wiederholt Ghrelin herzinsuffizienten Ratten, um per se eine inotrope Wirkung von Ghrelin nachzuweisen. Die Muskelzellen zeigten strukturelle Veränderungen und eine funktionelle Besserung der Muskelverkürzung.

Ein positiver Nebeneffekt der Untersuchung ergab eine Abmilderung der Entwicklung kardialer Kachexie [157], die im terminalen Stadium einer Herzinsuffizienz ein limitierender Faktor der Erkrankung ist. Eine direkte inotrope Wirkung von Ghrelin wurde nicht bestätigt.

5.2. Expression des Ghrelin-Peptids, physiologische Studien

Bis zum heutigen Zeitpunkt existieren kaum Ergebnisse über das Modulationsverhalten des Ghrelinpeptids und seines Rezeptors in nicht erkrankten menschlichen Geweben, da die Gewinnung dieser Gewebe aus ethischen Gesichtspunkten nicht ohne weiteres praktikabel ist. Da für die Untersuchung der Modulation der Vergleich zwischen physiologischem und insuffizientem Gewebe essentiell war, haben wir eine Kontrollgruppe herzgesunder Individuen aus kommerziell erworbenem Myokard kreiert. Einige Forscher untersuchten bereits den Benefit auf das kardiale System von Ghrelin an gesunden Menschen. Dabei applizierte man freiwilligen Studienteilnehmern Ghrelin. Einen Profit auf die Herzfunktion anhand der oben genannten Problematik konnten die Ergebnisse dieser Untersuchungen lediglich auf verschiedene Parameter der Herzfunktion (Steigerung der EF, Konstanz des MAP, Erhöhung des HI) einen Profit zeigen [51]. 2003 spezifizierten Enomoto et al. die Wirkung von Ghrelin auf das kardiomuskuläre System ebenfalls bei gesunden menschlichen Individuen. Dabei erhielten sechs gesunde Menschen Ghrelin in drei unterschiedlichen Dosierungen (1µg, 5µg oder 10µg) subkutan oder ein Placebo. Ghrelin erzeugte ebenfalls bei gesunden Menschen eine dosisabhängige Steigerung der GH-Ausschüttung [52].

Nagaya und Mitarbeiter verabreichten in einer randomisierten Studie sechs freiwilligen gesunden Menschen entweder einen Ghrelin-Bolus (10 µg/kg) oder ein Placebo. Die Ghrelingabe bewirkte einen fünfzehnfachen Anstieg des zirkulierenden GHs, was eine signifikante Senkung des MAP (-12 mmHg, $p < 0.05$) ohne signifikante Änderung der HF (-4 Schläge/min, $p = 0.39$) zur Folge hatte. Die Ghrelinapplikation führte außerdem zu signifikanten Anstiegen des Herzindexes (+16%, $p < 0.05$) und des Schlagvolumenindexes (+22%, $p < 0.05$) [55].

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigt unsere Studie in gesundem menschlichen Herzgewebe eine starke immunohistochemische Reaktion und im Einklang dazu qPCR-Transkripte für das Ghrelinpeptid. Unsere Hypothese, dass Ghrelin und dessen Rezeptor ubiquitär in Herzmuskelgewebe exprimiert wird, belegt die Tatsache, dass in den Vorhöfen und Ventrikeln keine ausschlaggebenden Unterschiede in der Anfärbbarkeit bestehen. Somit ist uns der erste experimentelle Nachweis gelungen, dass alle anatomischen Areale des Herzens gleichermaßen

Ghrelin und den Rezeptor exprimieren, und ergänzt die bislang über dieses Thema existierende Fachliteratur.

5.3. Expression des Rezeptors (GHS-R) in CHF-Gewebe

Initial gelang Katugampola und Mitarbeitern 2001 der Nachweis der Bindung von radioaktiv markiertem Ghrelin an gesundem menschlichen Gewebe und an Gewebe von Ratten. Die Expression von Ghrelin wurde auf mRNA zurückgeführt [124].

Weitere Versuche belegen die Up-Regulation bzw. Dichtezunahme der Ghrelinrezeptoren beispielsweise bei Vorliegen einer Arteriosklerose. Da Arteriosklerose als einer der Initialfaktoren für kardiovaskuläre Folgeerkrankungen wie KHK, periphere arterielle Verschlusskrankheit, apoplektischer Insult und Herzinsuffizienz gilt, weckte dieses Phänomen der Rezeptormodulation großes Interesse an der Pathophysiologie und ließ auf einen reaktiven Kompensationsmechanismus bei kardiovaskulärer Bedrohung durch Krankheit schließen [124].

Unsere Studie greift diesen Gedanken ebenfalls auf und weist eine Umverteilung von Peptid und Rezeptor als Kompensationsmechanismus einer chronisch terminalen Herzinsuffizienz nach. Die Bestätigung dieses Nachweises wird das Ziel weiterer Untersuchungen sein mit der Hoffnung, daraus eine Therapieoption für Herzinsuffizienz zu entwickeln.

Die Ergebnisse unserer Studie übertreffen die von Katugampola [124], da sie eine deutliche Alteration der Rezeptorexpression in der Studiengruppe um den Faktor 10 zeigen. Die Alteration bestätigt somit unsere Präsomtion, dass ein kompensatorischer Mechanismus bei geschädigtem Herzmuskelgewebe durch Modulation von Rezeptor und Peptid existiert.

Eine quantitative Vermehrung der Rezeptoren ermöglicht eine höhere Bindungsanzahl von Ghrelin-Rezeptor und Peptid und führt idealerweise zu einer Alteration der GH-Ausschüttung und dadurch zu einer ventrikulären Leistungssteigerung mit allen bereits genannten positiven Effekten auf die Herzparameter. Das Therapieziel wird somit eine Leistungssteigerung zur Mobilisation von kardialen Reserven vor vollständigem Versagen sein.

5.4. Expression des Rezeptors (GHS-R) in nicht erkranktem Gewebe

Unsere Ergebnisse über die Rezeptorexpression in gesundem Gewebe stimmen ebenfalls mit denen der aktuellen Studienlage überein und ergeben im Gegensatz zur Studiengruppe eine geringere Expression des Rezeptors bei hoher ubiquitärer

Ghrelinpeptidexpression. Die Diskrepanz zwischen gesundem und erkranktem Gewebe wird logisch gefolgert: Pathologisch verändertes Herzgewebe ist in seiner Leistungsfähigkeit deutlich eingeschränkt. Pineiro et al. [158] belegten in einer Studie, dass gesunde Herzmuskelzellen selbst in der Lage sind, in einem gewissen Maße Ghrelin zu synthetisieren. Die Annahme, erkranktes Herzgewebe könne nicht mehr in diesem Rahmen Ghrelin synthetisieren, bestätigt unsere Ergebnisse: Verringerung des Peptids und eine kompensatorische Erhöhung des Rezeptors bei Herzinsuffizienz.

In fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung kann der Körper dadurch nicht mehr adäquat mit arteriellem Blut versorgt werden. Dieser Zustand ist als dekompensierte Herzinsuffizienz definiert (siehe Punkt 1.1.1.). Die Modulation der Peptid- und Rezeptorverteilung spricht für einen Kompensationsmechanismus mit dem Ziel, durch eine höhere Rezeptordichte mehr Ghrelinmoleküle zu binden und damit letzte Reserven zu mobilisieren (Schlüssel-Schloss-Prinzip).

Unsere Kontrollgruppe weist bei gesundem Myokardgewebe im Vergleich zu erkranktem Gewebe dementsprechend eine verminderte Expression des Rezeptors auf.

5.5. Mögliche Wirkung auf EF

Studien belegen wie oben genannt die Steigerung des Schlagvolumens durch Ghrelingabe [21], die Verminderung der linksventrikulären Dilatation [61] und die Steigerung der Herzmuskelkontraktion [159] durch Ghrelin [55].

Diese positiven Effekte lassen sich auch rechnerisch mit dem Verhältnis (EF) des enddiastolischen Volumens als Minuenden und des endsystolischen Volumens als Subtrahenden zum enddiastolischen Volumen nachweisen. Damit führt entweder eine Vergrößerung des Dividenden, Verringerung des Subtrahenden/Divisors oder eine Verringerung des Subtrahenden zu einer Erhöhung der EF.

Unsere Studie belegt eine quantitative Zunahme der Rezeptoren bei terminaler Herzinsuffizienz. Nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip steigt damit die Bindungswahrscheinlichkeit des Ghrelinpeptids und ermöglicht idealerweise eine Zunahme der Herzleistung über eine gesteigerte GH-Ausschüttung.

Wie bereits erwähnt, wirkt Ghrelin auf den GHS-R (Ghrelin-Rezeptor) und bewirkt über eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung via IP_3 , beides Botenstoffe der Zelle, einen Stimulus zur Freisetzung von GH. Ghrelin wirkt auf die GH-Freisetzung ähnlich wie GHRH [18, 68, 69, 76], jedoch dreifach stärker [68].

Versuche an Tieren [18] und Menschen [76] belegen eine potente GH-Freisetzung durch Ghrelinapplikation.

Ghrelin verringert den arteriellen Mitteldruck, ohne die Herzfrequenz zu verändern [55, 125]. Da die Koronardurchblutung vorwiegend in der Diastole (Füllungsphase der Herzaktion) stattfindet, und eine Erhöhung der Herzfrequenz/Tachykardie jedoch zur Verkürzung der Diastole führt, nimmt die Koronardurchblutung ab. Diese Abnahme bewirkt eine Minderversorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff, Kontraktilität und Schlagvolumen nehmen ab - es kommt zu einer unzureichenden Ventrikelfüllung, die in einer insuffizienten Herzaktion resultiert.

5.6. Limitationen der Studie

5.6.1 Studiendesign

Limitationen der vorliegenden Studie ergeben sich aus dem Vorliegen einer experimentellen nicht-randomisierten Single-Center-Studie. Die Ausgangsbedingungen dieser monozentrischen Studie sind eine kleine Studiengruppe und eine kleinere Kontrollgruppe. Aus ethischen Gründen war es nicht möglich, eine gleichgroße Kontrollgruppe zu schaffen. Wäre die Generierung zwei gleichgroßer Gruppen gelungen, hätte die statistische Auswertung wohl eine höhere wissenschaftliche Aussagekraft. Das zahlenmäßige Ungleichgewicht macht zwar eine statistische Auswertung schwierig, musste aber in Kauf genommen werden um die Untersuchung überhaupt durchzuführen zu können. Zusätzlich ist die Zahl der Untersucher im Gegensatz zu größeren Multicenter-Studien geringer, bei denen eine weitaus größere Studiengruppe generiert werden könnte.

Darüber hinaus kann eine höhere Anzahl von Untersuchern bei einem standardisierten Vorgehen eine homogene Schnittmenge aus den Ergebnissen bilden. Die so erhaltenen Ergebnisse wären miteinander besser vergleichbar und aussagekräftiger.

Wir haben in diesem Rahmen erstmals die Theorie der Modulation von Ghrelin und dessen Rezeptor an menschlichen Individuen mit terminaler Herzinsuffizienz untersucht. Dabei war eine geringere Studienteilnehmerzahl von Vorteil, um bei einem unbekanntem Ergebnis die hohen Kosten für immunologische und PCR-Analysen in ein ökonomisches Verhältnis zu setzen. Wir konnten erstmals am Menschen unter praktischen Bedingungen die Modulation der Expression von Ghrelin und des GHS-R bei Herzinsuffizienz und Herzgesunden belegen.

Der Nachteil einer Single-Center-Studie, durch die limitierte Untersucherzahl eine eingeschränkte wissenschaftliche Aussagekraft zu erhalten, wurde hinsichtlich der Fragestellung, ob sich die Modulation des Rezeptors bei Herzinsuffizienz konträr zu physiologischen Bedingungen verhält, in Kauf genommen.

Da die angewandten technischen Untersuchungen (immunohistochemische Färbungen und RT-PCR) zurzeit leider noch sehr teuer sind, bestand im Vorfeld nicht die Möglichkeit, das Verfahren zu testen. In diesem Sinne handelt es sich bei unserer Untersuchung um eine Pilot-Studie, in der unsere Hypothese bestätigt wird, dass pathophysiologische Veränderungen zur Modulation der Expression von Ghrelin und dem Ghrelin-Rezeptor führen.

5.6.2 Technische Limitationen

Die Aussagekraft von immunhistochemischen Verfahren zum Nachweis der Expression von verschiedenen Molekülen und Antigenen in Gewebe kann durch verschiedene methodische Probleme eingeschränkt sein, so dass die erhaltenen Ergebnisse kritisch analysiert werden müssen.

Technische Limitationen können beispielsweise durch die Zerstörung der antigenen Epitope bei der Gewebspräparation, Fixation, Einbettung oder bei unterschiedlicher Schnittdicke der Präparate entstehen, die zu einer quantitativen Verminderung der Antigen-Antikörperkomplexe führen. In den Reaktionen wird der endogenen Peroxidase Wasserstoffperoxid als Substrat angeboten, wodurch Protonen und Wasser freigesetzt werden. Das vorher fast farblose Chromogen wird zu einem farbigen Endprodukt oxidiert. Wird die Aktivität der endogenen Peroxidase nicht unterbrochen, kann es dadurch weiterhin zur Bildung chromogener Komplexe und somit zu falsch erhöhten Ergebnissen kommen.

In unserer Untersuchung wurde die Aktivität der endogenen Peroxidase durch einen abschließenden Spülgang mit destilliertem Wasser beendet. Auch unspezifische Hintergrundfärbungen können die Aussagekraft, meist falsch positiv, beeinflussen. Werden Antikörper an stark positiv geladene Gewebeanteile oder durch hydrophobe Wechselwirkungen hervorgerufene unspezifische Proteinbindung gebunden, kommt es ebenfalls zu falsch positiven Ergebnissen. Zur Minimierung der unspezifischen Bindungen wurde vor Zugabe des Primärantikörpers die Bindungsfreudigkeit mit einer neutralen Proteinelösung (Blocking Reagent (Dako®)) unterbunden. Zusätzlich entstehen falsch positive Antigen-Antikörper-Komplexe durch Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen. Kreuzreaktivität ist als Bindung des Antikörpers mit anderen Proteinen, die das gleiche Epitop besitzen, definiert.

Je höher die Affinität des Epitops zum zu untersuchenden Antigen ist, desto geringer ist die Fehleranfälligkeit. Zur Verifizierung der Spezifität der immunhistochemischen Färbungen sind Negativkontrollen essentiell, bei denen es zu keinem Farbausschlag kommen darf. Die Durchführung von Positivkontrollen belegt an sicher positivem

Material eine Färbung. Diese Maßnahmen sind für die Spezifität der Färbungen ausschlaggebend.

In allen Gruppen unserer Studie wurden Negativkontrollen durchgeführt, die durch verschiedene Interventionen innerhalb der immunohistochemischen Färbung zu einem Ausbleiben der Färbereaktion führten. In diesem Rahmen wurde jeder essentielle Schritt der Immunreaktion ausgelassen, der primäre Antikörper wurde durch normales Serum in passender Verdünnung ersetzt, der Anti-Ghrelin-Antikörper wurde an das homologe Antigen präadsorbiert und es wurde ein anderes Anti-Ghrelin-Antiserum verwendet. Als Positivkontrollen wurde für die Immunfärbung von Ghrelin und des Ghrelin-Rezeptors-1a mit Material aus dem Magen von Ratten eingeschlossen.

5.6.3 Unmöglichkeit der Generation einer authentischen Kontrollgruppe

Das Manko unserer Untersuchung besteht aus dem zahlenmäßigen Ungleichgewicht der Studiengruppe (n=12) und der Kontrollgruppe (n=3). Die Generierung einer größeren Kontrollgruppe stellte sich aus ethischer Sicht äußerst problematisch dar, da es nicht möglich ist, Gewebe von herzgesunden Individuen in vivo in einem vergleichbar ausreichenden Maße zu erhalten. Es wäre nicht zu verantworten, selbst wenn eine Einverständniserklärung eines gesunden Patienten vorläge, Gewebe aus beiden Ventrikeln und Vorhöfen zu entnehmen. Aus diesem Aspekt war die Durchführung unserer Untersuchung nur mit der Kreierung einer Kontrollgruppe aus kommerziell erworbenen Myokardproben und von Autopsien gewonnener Proben möglich. Durch das ungleiche Zahlenverhältnis beider Gruppen liegen demnach bezüglich unserer Fragestellung Mittelwerte mit einer geringeren Aussagekraft vor, wie wenn man insgesamt größere und vor allem zahlenmäßig gleich große Gruppen untersucht hätte. Zudem gestaltet sich dadurch die statistische Auswertung schwierig. Im Rahmen unserer Pilotstudie und der Ungewissheit, ob die Theorie der angesprochenen Modulation von Ghrelin und dessen Rezeptor überhaupt bestätigt werden kann, haben wir diese Gegebenheiten auch aus wirtschaftlichen Gründen in Kauf genommen.

5.6.4 Mögliche physiologische Diskrepanz zwischen „in vivo“ und „post-mortem“-Gewebe

Problematisch gestaltet sich die Verwendung der Begrifflichkeit „in vivo“ bei den entnommenen Proben der Kontrollgruppe, da es sich hier um Gewebe verstorbener

Patienten handelt. Es wurden zwar alle Proben innerhalb 24 Stunden post-mortem entnommen, jedoch ist der Ausschluss von Dysregulationsvorgängen des Expressionsverhaltens auf Grund pathophysiologischer Vorgänge bei mortalem Gewebe, die in diesem Zeitraum stattfinden könnten, nicht möglich. Geht man von dysregulatorischen Prozessen aus, muss korrekterweise der Terminus „post-mortales Gewebe“ anstatt „in vivo“ verwendet werden. Somit bleibt ungeklärt, ob es durch die Verwendung von nicht-frischem Gewebe zu falsch-positiven oder auch zu falsch-negativen Werten kommt. Jedoch ist die Aussage zulässig, dass wohl bei vorliegender terminaler Herzinsuffizienz im Vergleich zu post-mortalen/nicht kardial-erkrankten Gewebsproben eine gegenläufige Regulation der Expression des Ghrelinpeptids und seinem Rezeptor stattfindet. Zur weiteren Evaluation, ob Ghrelin eine mögliche Therapie zur Behandlung der Herzinsuffizienz werden kann, sollte hinsichtlich dieses Problems bei aufbauenden Studien eine Lösung zur Gewinnung von in-vivo Gewebsproben gefunden werden, um eine physiologisch einwandfreie Kontrollgruppe zu erhalten. Hinsichtlich der weiterhin bestehenden ethischen Problematik wird es sich auch zukünftig schwierig gestalten.

5.6.5 Möglichkeit der Inhomogenität der erworbenen Kontrollen

Eine weitere Fehlerquelle könnte in der Verwendung der kommerziell erworbenen Myokardproben liegen, da bei unbekannter Patientenvorgeschichte eine Inhomogenität zwischen der tatsächlichen Kontrollgruppe und den erworbenen Proben selbst nicht auszuschließen ist. Wir haben Myokard-RNA von Ambion®, Austin, TX, USA erworben, wobei die einzige Vorgabe war, dass das Gewebe von herzgesunden Individuen stammt. Inwieweit strukturelle Herzerkrankungen sicher ausgeschlossen werden können, ist nicht bekannt. Auch können methodische Fehlerquellen bei der Konservierung und Verarbeitung des Gewebes bis zu unserer Untersuchung nicht ausgeschlossen werden.

5.7. Zukunft

5.7.1. Zukunft – aktuelle Studienlage

Jüngste Studien von Akashi et al. [160] stellen die Ergebnisse früherer Studien über den Benefit von Ghrelin auf die Herzfunktion in Frage. Sie untersuchten den Effekt von Ghrelingabe über vier Wochen anhand zweier verschiedener Applikationsrouten bezüglich Nahrungsaufnahme, Körpergewicht, Körperkomposition und Herzfunktion bei Ratten mit CHF. Beide Applikationsarten (Ghrelin-Infusionspumpe vs. dreimal täglicher Subkutaninjektion) zeigten einen deutlichen Benefit auf Körperkomposition und

Körpergewicht, jedoch wurde kein positiver Effekt auf die Herzfunktion nachgewiesen [160]. Diese Ergebnisse stellen die früheren Studien in Frage, die nämlich einen signifikanten Nutzen auf die Herzfunktion bei subkutaner und intravenöser Ghrelingabe belegen konnten [20, 61]. Ghrelingabe bewirkte hier zum einen eine Zunahme der linksventrikulären Ejektionsfraktion und der linksventrikulären Muskelmasse, und zum anderen eine Abnahme des endsystolischen Volumens und der Neigung zur kardialen Kachexie. Zwischen früheren Studien [20, 61] und der vorliegenden aktuellen Studie [160] bestehen Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede, die jedoch nicht für den essentiellen Unterschied des Ergebnisses verantwortlich sein können. Bei den Studien von Akashi et al. war das Infarktausmaß größer als in Vergleichsstudien und zur Untersuchung wurde ein anderer Rattenstamm verwendet. Es bestand kein Unterschied in den Applikationsformen. Laut Akashi et al. liegt das Manko in der Analyse einer zu kleinen Patientengruppe und dem nicht-verblindeten und kurzzeitigen Studiendesign. Die physiologischen Effekte, die für die Zunahme der linksventrikulären Herzfunktion und Übungskapazität in den Studien von Nagaya et al. [20, 61] verantwortlich sind, werden zu einem großen Teil auf vasodilatatorische Einwirkungen zurückgeführt. Untersuchungen zur vasodilatatorischen Funktion bei Ghrelingabe ergaben eine Vasokonstriktion, die -wie man annimmt- durch eine Entkoppelung der endothelialen NOS zustande kommt [161].

Der vasodilatatorische Effekt von GHS und Ghrelin kann wegen verschiedener Versuchsbedingungen und unterschiedlicher Dosierungen während der Versuche in der Literatur derzeit leider nicht einheitlich und widerspruchsfrei wiedergegeben werden.

5.7.2. Ausblick

Unsere Pilotstudie bestätigt die These, dass bei pathophysiologisch verändertem Myokardgewebe die Modulation der Expression zu Gunsten des Ghrelinrezeptors verschoben wird. Diese Veränderungen finden konträr zu physiologischen Ausgangsbedingungen statt.

Als nächster wissenschaftlicher Schritt ist die Durchführung einer großen kontrollierten randomisierten Multi-Center-Studie anzustreben, deren primärer Endpunkt beispielsweise als Ejektionsfraktion (EF) festgelegt wird. Ausgehend von diesem primären Endpunkt können zwei Gruppen gebildet werden. Die EF wird bei beiden Gruppen untersucht, bei der einen Gruppe unter weiterer Ghrelingabe, bei der anderen Gruppe unter Anwendung einer etablierten medikamentösen Herzinsuffizienztherapie (β -Blocker, ACE-Hemmer, Ca^{2+} -Antagonisten, Aldosteronantagonisten, Angiotensin-II-Kanalblocker).

Das Ergebnis unserer Pilotstudie erlaubt die Aussage, dass Veränderungen stattfinden, und lässt die Festlegung des primären Endpunktes zu.

Ein Vergleich „Ghrelingabe“ vs. „Ghrelingabe und konventionelle Therapie“ könnte eine interessante Fragestellung sein, um einen Benefit bei Ghrelingabe und zusätzlicher konventioneller Therapie zu qualifizieren.

Wird die Studie an mehreren kardiochirurgischen Zentren unter gleichen Bedingungen durchgeführt, erhalten die Ergebnisse wegen einer höheren Studienteilnehmerzahl eine deutlich höhere wissenschaftliche Aussagekraft.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit ist, die gegenläufige Modulation des Peptids Ghrelin und seinem Rezeptor (GHS-R) erstmals an menschlichem Myokardgewebe bei vorliegender Herzinsuffizienz (CHF) zu belegen und darzustellen, dass zwischen den untersuchten Arealen keine Unterschiede in der Expression bestehen.

Ghrelin ist ein Peptid, das vornehmlich im Magen produziert wird und als endogener Ligand für den Rezeptor (GHS-R1a) des Wachstumshormons (GH, Somatotropin) eine Freisetzung von GH in der Hypophyse bewirkt. Es wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert und übt vielfältige Funktionen auf den Stoffwechsel aus, stimuliert über hypothalamische Neurone das Appetitverhalten und nimmt Einfluss auf das gastrointestinale und kardiale System. Ghrelin steigert die Herzleistung durch Zunahme der Ejektionsfraktion, des Herzindexes und des Schlagvolumenindex, während es den mittleren arteriellen Druck verringert. Ghrelin verbessert die linksventrikuläre Dysfunktion, inhibiert Zelluntergang, verhindert linksventrikuläres Remodeling und wirkt kardialer Kachexie entgegen.

Die Ergebnisse dieser Studie sollen dazu beitragen, anhand des belegten Mechanismus langfristig einen Therapieansatz zur kardialen Leistungssteigerung bei Herzinsuffizienz zu entwickeln.

Das insuffiziente Myokardgewebe wurde unter sterilen Kautelen während des kardiochirurgischen Eingriffs an definierten anatomischen Stellen entnommen und zur weiteren Verarbeitung konserviert. Nach immunhistochemischer Aufarbeitung mit polyklonalen Antikörpern und RT-PCR wurde die Modulation des Ghrelinpeptids und seines Rezeptors untersucht und mit physiologischem Gewebe verglichen.

Die Untersuchung des gesunden menschlichen Myokardgewebes ergab eine starke Immunreaktion für das Ghrelinpeptid und gleichzeitig eine schwache Färbung für den GHS-Rezeptor. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen der RT-PCR-Untersuchungen und mit den Ergebnissen der aktuellen Studienlage.

Unsere immunhistochemischen Untersuchungen wurden mit spezifischen polyklonalen Antikörpern durchgeführt und zeigten dazu gegenläufig eine deutliche Änderung des Expressionsverhaltens von Ghrelin und des GHS-R bei vorliegender Herzinsuffizienz. Bei CHF war sich eine erniedrigte Immunreaktion für das Ghrelinpeptid bei einer stark erhöhten Färbung für den GHS-R zu registrieren.

Unsere Studie bestätigt im Einklang mit der aktuellen Studienlage die Expression von Ghrelin und GHS in menschlichem Myokard und zum ersten Mal belegt eine Studie in der Literatur, dass in der Expression kein signifikanter Unterschied zwischen den

anatomischen Arealen besteht und eine konträre Umverteilung des Expressionsmusters bei CHF im Vergleich zu physiologischen Zuständen stattfindet: bei CHF ein erniedrigter Ghrelinspiegel und erhöhter Spiegel des GHS-Rezeptors.

Die erzielten Ergebnisse beweisen unsere These, dass das Ghrelinsystem durch myokardiale Expression des Peptids an der Regulation der Herzfunktion beteiligt ist – ja sogar den Rückschluss zulässt, dass bei geschädigter Herzmuskelfunktion eine verminderte Ghrelinproduktion stattfindet. Da der positive Effekt von Ghrelin auf die Herzfunktion von zahlreichen Autoren belegt ist, ist auch der Rückschluss auf dysfunktionale Veränderungen über eine verminderte Ghrelinproduktion erlaubt.

In naher Zukunft werden weitere Studien zur exakten Untersuchung des Ghrelinsystems bei Herzinsuffizienz notwendig sein, um mit dem Potential von Ghrelin als pharmakologischer Modulator neue therapeutische Perspektiven zu eröffnen.

CONCLUSION

The aim of our study was to establish the first time a contrary modulation of the ghrelin peptide and its receptor (GHS-R) in human myocardium at the presence of terminal heart failure (CHF).

Ghrelin is a peptide, which is primarily produced in the stomach and effects as endogen ligand for the receptor (GHS-R) of somatotrophin (GH) the release of GH in the pituitary. Ghrelin is expressed in many different tissues and performs a lot of functions in the metabolism. It stimulates the appetite via hypothalamic neurons and has an enormous effect on the cardiac and the gastrointestinal system. Ghrelin increases the cardiac capacity through improvement of the ejection fraction (EF), the heart index and the stroke-volume-index and through reduction of the mean arterial pressure. Additional it improves the left ventricular dysfunction, inhibits the cell death, the left ventricular remodeling and the cardiac cachexia.

According to the results of our study a long-lasting attempt of therapy increasing of cardiac function to treat terminal heart failure could be developed.

The samples of the insufficient myocardium were extracted under sterile conditions at definite anatomical locations during the surgery and were preserved for further proceeding. The samples have been proceeded with immunohistochemical techniques and polyclonal antibodies. Furthermore the modulation of the ghrelin peptide and its receptor was established by RT-PCR and compared with the expression of healthy myocardium.

The survey of the healthy myocardium shows a strong immunohistochemic gain for the ghrelin peptide and a decreased gain for the receptor GHS-R. This results correlate with the current study results. The study was performed by using specific polyclonal antibodies. Investigating the modulation of the expression of the peptide and the receptor show a contrary modulation by CHF. The survey of CHF tissues shows compared to the control group a decreased immunohistochemistry for the ghrelin peptide and an increased reaction for its receptor (GHS-R).

This study indicates in accordance with current study results the expression of the ghrelin peptide and his receptor in human myocardium and shows the first time in literature, that there is no significant difference in the expression among the anatomical areas. Moreover the study amounts that there is a contrary pattern of expression of the CHF group compared with the control group, that shows at CHF increased ghrelin levels and decreased GHS-R levels.

The results prove that the ghrelin system is involved in the regulation of the heart function by its myocardial expressing of the peptide. So an impaired myocardial function results in an impaired myocardial ghrelin expression. In addition to numerous authors a decrease of the ghrelin production is followed by failing myocardium.

In future, additional studies are required to investigate exactly the ghrelin system during a heart failure, to occur the enormous potential of ghrelin new therapeutic perspectives for a new pharmacologic modulator.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. McMurray, J.J. and S. Stewart, *Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure*. Heart, 2000. **83**(5): p. 596-602.
2. Lloyd-Jones, D.M., et al., *Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study*. Circulation, 2002. **106**(24): p. 3068-72.
3. Djousse, L., J.A. Driver, and J.M. Gaziano, *Relation between modifiable lifestyle factors and lifetime risk of heart failure*. JAMA, 2009. **302**(4): p. 394-400.
4. Herold, G., *Innere Medizin*. 2006, Köln: Dr. med. Gerd Herold.
5. Levy, D., et al., *The progression from hypertension to congestive heart failure*. JAMA, 1996. **275**(20): p. 1557-62.
6. Senni, M. and M.M. Redfield, *Heart failure with preserved systolic function. A different natural history?* J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(5): p. 1277-82.
7. WHO, *Physician Guidelines (for GPs) designed to be translated and distributed worldwide to primary care physicians*. . 1995.
8. Jackson, G., et al., *ABC of heart failure. Pathophysiology*. BMJ, 2000. **320**(7228): p. 167-70.
9. Pieske, B., et al., *Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy*. Circulation, 1995. **92**(5): p. 1169-78.
10. Mulieri, L.A., et al., *Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure*. Circulation, 1992. **85**(5): p. 1743-50.
11. Colucci, W.S., *In vivo studies of myocardial beta-adrenergic receptor pharmacology in patients with congestive heart failure*. Circulation, 1990. **82**(2 Suppl): p. I44-51.
12. Morishita, R., et al., *Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy. In vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme*. J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 978-84.
13. Unger, T. and J. Li, *The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2004. **5 Suppl 1**: p. S7-10.
14. Schmidt, R.-F.T., G, *Physiologie des Menschen*. 1995: Springer. 541 f., 785, 787.
15. Olivetti, G., et al., *Apoptosis in the failing human heart*. N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1131-41.
16. Narula, J., et al., *Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure*. N Engl J Med, 1996. **335**(16): p. 1182-9.
17. Weber, K.T., *Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation*. Circulation, 1997. **96**(11): p. 4065-82.
18. Kojima, M., et al., *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 656-60.
19. Cassoni, P., et al., *Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(4): p. 1738-45.
20. Nagaya, N., et al., *Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure*. Circulation, 2004. **110**(24): p. 3674-9.
21. Nagaya, N. and K. Kangawa, *Ghrelin improves left ventricular dysfunction and cardiac cachexia in heart failure*. Curr Opin Pharmacol, 2003. **3**(2): p. 146-51.
22. Bowers, C.Y., et al., *Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro*. Endocrinology, 1980. **106**(3): p. 663-7.

23. Momany, F.A., et al., *Design, synthesis, and biological activity of peptides which release growth hormone in vitro*. *Endocrinology*, 1981. **108**(1): p. 31-9.
24. Thorner, M.O., et al., *Growth hormone-releasing hormone and growth hormone-releasing peptide as therapeutic agents to enhance growth hormone secretion in disease and aging*. *Recent Prog Horm Res*, 1997. **52**: p. 215-44; discussion 244-6.
25. Akman, M.S., et al., *Mechanisms of action of a second generation growth hormone-releasing peptide (Ala-His-D-beta Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) in rat anterior pituitary cells*. *Endocrinology*, 1993. **132**(3): p. 1286-91.
26. Blake, A.D. and R.G. Smith, *Desensitization studies using perfused rat pituitary cells show that growth hormone-releasing hormone and His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ stimulate growth hormone release through distinct receptor sites*. *J Endocrinol*, 1991. **129**(1): p. 11-9.
27. Cheng, K., et al., *The synergistic effects of His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ on growth hormone (GH)-releasing factor-stimulated GH release and intracellular adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in rat primary pituitary cell culture*. *Endocrinology*, 1989. **124**(6): p. 2791-8.
28. Cheng, K., et al., *Evidence for a role of protein kinase-C in His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂-induced growth hormone release from rat primary pituitary cells*. *Endocrinology*, 1991. **129**(6): p. 3337-42.
29. Popovic, V., et al., *Evaluation of pituitary GH reserve with GHRP-6*. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 1996. **9 Suppl 3**: p. 289-98.
30. Kojima, M. and K. Kangawa, *Ghrelin: structure and function*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(2): p. 495-522.
31. Smith, R.G., et al., *Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion*. *Endocr Rev*, 1997. **18**(5): p. 621-45.
32. Howard, A.D., et al., *A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release*. *Science*, 1996. **273**(5277): p. 974-7.
33. Bednarek, M.A., et al., *Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a*. *J Med Chem*, 2000. **43**(23): p. 4370-6.
34. Deghenghi, R., et al., *Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland*. *J Endocrinol Invest*, 2001. **24**(1): p. RC1-3.
35. Ghigo, E., et al., *Biologic activities of growth hormone secretagogues in humans*. *Endocrine*, 2001. **14**(1): p. 87-93.
36. Muccioli, G., et al., *Heterogeneity of ghrelin/growth hormone secretagogue receptors. Toward the understanding of the molecular identity of novel ghrelin/GHS receptors*. *Neuroendocrinology*, 2007. **86**(3): p. 147-64.
37. Veeraragavan, K., K. Sethumadhavan, and C.Y. Bowers, *Growth hormone-releasing peptide (GHRP) binding to porcine anterior pituitary and hypothalamic membranes*. *Life Sci*, 1992. **50**(16): p. 1149-55.
38. Bowers, C.Y., *GH releasing peptides--structure and kinetics*. *J Pediatr Endocrinol*, 1993. **6**(1): p. 21-31.
39. Bowers, C.Y., *On a peptidomimetic growth hormone-releasing peptide*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994. **79**(4): p. 940-2.
40. Bowers, C.Y., *Growth hormone-releasing peptide (GHRP)*. *Cell Mol Life Sci*, 1998. **54**(12): p. 1316-29.
41. Camanni, F., E. Ghigo, and E. Arvat, *Growth hormone-releasing peptides and their analogs*. *Front Neuroendocrinol*, 1998. **19**(1): p. 47-72.
42. Chang, C.H., et al., *Activity of a novel nonpeptidyl growth hormone secretagogue, L-700,653, in swine*. *Endocrinology*, 1995. **136**(3): p. 1065-71.

43. Deghenghi, R., et al., *Small peptides as potent releasers of growth hormone*. J Pediatr Endocrinol Metab, 1995. **8**(4): p. 311-3.
44. Hansen, T.K., et al., *Highly potent growth hormone secretagogues: hybrids of NN703 and ipamorelin*. Bioorg Med Chem Lett, 2001. **11**(14): p. 1915-8.
45. Muccioli, G., et al., *Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity*. Eur J Pharmacol, 2002. **440**(2-3): p. 235-54.
46. Pan, L.C., et al., *Preclinical pharmacology of CP-424,391, an orally active pyrazolinone-piperidine [correction of pyrazolidinone-piperidine] growth hormone secretagogue*. Endocrine, 2001. **14**(1): p. 121-32.
47. Raun, K., et al., *Ipamorelin, the first selective growth hormone secretagogue*. Eur J Endocrinol, 1998. **139**(5): p. 552-61.
48. Momany, F.A., et al., *Conformational energy studies and in vitro and in vivo activity data on growth hormone-releasing peptides*. Endocrinology, 1984. **114**(5): p. 1531-6.
49. van der Lely, A.J., et al., *Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin*. Endocr Rev, 2004. **25**(3): p. 426-57.
50. Bisi, G., et al., *Acute cardiovascular and hormonal effects of GH and hexarelin, a synthetic GH-releasing peptide, in humans*. J Endocrinol Invest, 1999. **22**(4): p. 266-72.
51. Bisi, G., et al., *Cardiac effects of hexarelin in hypopituitary adults*. Eur J Pharmacol, 1999. **381**(1): p. 31-8.
52. Enomoto, M., et al., *Cardiovascular and hormonal effects of subcutaneous administration of ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in healthy humans*. Clin Sci (Lond), 2003. **105**(4): p. 431-5.
53. Stromer, H., et al., *Exogenously administered growth hormone and insulin-like growth factor-I alter intracellular Ca²⁺ handling and enhance cardiac performance. In vitro evaluation in the isolated isovolumic buffer-perfused rat heart*. Circ Res, 1996. **79**(2): p. 227-36.
54. Shimizu, Y., et al., *Ghrelin improves endothelial dysfunction through growth hormone-independent mechanisms in rats*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **310**(3): p. 830-5.
55. Nagaya, N., et al., *Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. **280**(5): p. R1483-7.
56. Sharma, V. and J.H. McNeill, *The emerging roles of leptin and ghrelin in cardiovascular physiology and pathophysiology*. Curr Vasc Pharmacol, 2005. **3**(2): p. 169-80.
57. Hedayati, N., et al., *Growth hormone-releasing peptide ghrelin inhibits homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries and human endothelial cells*. J Vasc Surg, 2009. **49**(1): p. 199-207.
58. De Gennaro Colonna, V., et al., *Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protection by hexarelin*. Eur J Pharmacol, 1997. **334**(2-3): p. 201-7.
59. Schwenke, D.O., et al., *Exogenous ghrelin attenuates the progression of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in conscious rats*. Endocrinology, 2008. **149**(1): p. 237-44.
60. Tivesten, A., et al., *The growth hormone secretagogue hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction*. Endocrinology, 2000. **141**(1): p. 60-6.
61. Nagaya, N., et al., *Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure*. Circulation, 2001. **104**(12): p. 1430-5.
62. Chang, L., et al., *Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart*. J Cardiovasc Pharmacol, 2004. **43**(2): p. 165-70.

63. Kamiji, M.M. and A. Inui, *The role of ghrelin and ghrelin analogues in wasting disease*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2008. **11**(4): p. 443-51.
64. Nagaya, N. and K. Kangawa, *Therapeutic potential of ghrelin in the treatment of heart failure*. *Drugs*, 2006. **66**(4): p. 439-48.
65. Broglio, F., et al., *Growth hormone-independent cardiotropic activities of growth hormone-releasing peptides in normal subjects, in patients with growth hormone deficiency, and in patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy*. *Endocrine*, 2001. **14**(1): p. 105-8.
66. Broglio, F., et al., *Effects of acute hexarelin administration on cardiac performance in patients with coronary artery disease during by-pass surgery*. *Eur J Pharmacol*, 2002. **448**(2-3): p. 193-200.
67. Arvat, E., et al., *Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(3): p. 1169-74.
68. Arvat, E., et al., *Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans*. *J Endocrinol Invest*, 2000. **23**(8): p. 493-5.
69. Takaya, K., et al., *Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(12): p. 4908-11.
70. Yamazaki, M., et al., *Regulatory effect of ghrelin on growth hormone secretion from perfused rat anterior pituitary cells*. *J Neuroendocrinol*, 2002. **14**(2): p. 156-62.
71. Date, Y., et al., *Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans*. *Endocrinology*, 2000. **141**(11): p. 4255-61.
72. Kamegai, J., et al., *Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression*. *Endocrinology*, 2000. **141**(12): p. 4797-800.
73. Tolle, V., et al., *In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat*. *Neuroendocrinology*, 2001. **73**(1): p. 54-61.
74. Di Vito, L., et al., *The GH-releasing effect of ghrelin, a natural GH secretagogue, is only blunted by the infusion of exogenous somatostatin in humans*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2002. **56**(5): p. 643-8.
75. Hataya, Y., et al., *A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(9): p. 4552.
76. Peino, R., et al., *Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans*. *Eur J Endocrinol*, 2000. **143**(6): p. R11-4.
77. Popovic, V., et al., *Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(7): p. 3450-3.
78. Wren, A.M., et al., *Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats*. *Diabetes*, 2001. **50**(11): p. 2540-7.
79. Tschop, M., D.L. Smiley, and M.L. Heiman, *Ghrelin induces adiposity in rodents*. *Nature*, 2000. **407**(6806): p. 908-13.
80. Horvath, T.L., et al., *Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance--a hypothalamic perspective*. *Endocrinology*, 2001. **142**(10): p. 4163-9.
81. Gautron, L. and J.K. Elmquist, *Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance*. *J Clin Invest*. **121**(6): p. 2087-93.
82. Tschop, M., et al., *Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity*. *Diabetes*, 2001. **50**(4): p. 707-9.
83. Cummings, D.E., et al., *A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans*. *Diabetes*, 2001. **50**(8): p. 1714-9.

84. Shiiya, T., et al., *Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(1): p. 240-4.
85. Ariyasu, H., et al., *Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(10): p. 4753-8.
86. Nakazato, M., et al., *A role for ghrelin in the central regulation of feeding*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 194-8.
87. Sun, Y., et al., *Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4679-84.
88. Wren, A.M., et al., *Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(12): p. 5992.
89. Cummings, D.E., K.E. Foster-Schubert, and J. Overduin, *Ghrelin and energy balance: focus on current controversies*. Curr Drug Targets, 2005. **6**(2): p. 153-69.
90. Gnanapavan, S., et al., *The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(6): p. 2988.
91. Dixit, V.D., et al., *Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells*. J Clin Invest, 2004. **114**(1): p. 57-66.
92. Li, W.G., et al., *Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells*. Circulation, 2004. **109**(18): p. 2221-6.
93. Chang, L., et al., *Therapeutic effects of ghrelin on endotoxic shock in rats*. Eur J Pharmacol, 2003. **473**(2-3): p. 171-6.
94. Koo, G.C., et al., *Immune enhancing effect of a growth hormone secretagogue*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 4195-201.
95. El Eter, E., et al., *In vivo and in vitro antioxidant activity of ghrelin: Attenuation of gastric ischemic injury in the rat*. J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(11): p. 1791-9.
96. Baldanzi, G., et al., *Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT*. J Cell Biol, 2002. **159**(6): p. 1029-37.
97. Mazzocchi, G., et al., *Ghrelin enhances the growth of cultured human adrenal zona glomerulosa cells by exerting MAPK-mediated proliferogenic and antiapoptotic effects*. Peptides, 2004. **25**(8): p. 1269-77.
98. Kim, M.S., et al., *The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(9): p. 2291-301.
99. Maccarinelli, G., et al., *Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells*. J Endocrinol, 2005. **184**(1): p. 249-56.
100. Granata, R., et al., *Unacylated as well as acylated ghrelin promotes cell survival and inhibit apoptosis in HIT-T15 pancreatic beta-cells*. J Endocrinol Invest, 2006. **29**(9): p. RC19-22.
101. Nakahara, K., et al., *Maternal ghrelin plays an important role in rat fetal development during pregnancy*. Endocrinology, 2006. **147**(3): p. 1333-42.
102. Cassoni, P., et al., *Ghrelin and cortistatin in lung cancer: expression of peptides and related receptors in human primary tumors and in vitro effect on the H345 small cell carcinoma cell line*. J Endocrinol Invest, 2006. **29**(9): p. 781-90.
103. Volante, M., et al., *Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(3): p. 1300-8.
104. Cassoni, P., et al., *Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines*. Eur J Endocrinol, 2004. **150**(2): p. 173-84.

105. Murata, M., et al., *Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 5667-74.
106. Jeffery, P.L., A.C. Herington, and L.K. Chopin, *Expression and action of the growth hormone releasing peptide ghrelin and its receptor in prostate cancer cell lines*. J Endocrinol, 2002. **172**(3): p. R7-11.
107. Duxbury, M.S., et al., *Ghrelin promotes pancreatic adenocarcinoma cellular proliferation and invasiveness*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **309**(2): p. 464-8.
108. Penicaud, L., et al., *Brain glucose sensing: a subtle mechanism*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006. **9**(4): p. 458-62.
109. Wang, W.G., et al., *Effects of ghrelin on glucose-sensing and gastric distension sensitive neurons in rat dorsal vagal complex*. Regul Pept, 2008. **146**(1-3): p. 169-75.
110. Heijboer, A.C., et al., *Ghrelin differentially affects hepatic and peripheral insulin sensitivity in mice*. Diabetologia, 2006. **49**(4): p. 732-8.
111. Ott, V., et al., *Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression*. Horm Metab Res, 2002. **34**(11-12): p. 640-5.
112. Broglio, F., et al., *Effects of ghrelin on the insulin and glycemic responses to glucose, arginine, or free fatty acids load in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(9): p. 4268-72.
113. Gauna, C., et al., *Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(2): p. 1055-60.
114. Barazzoni, R., et al., *Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(1): p. E228-35.
115. Patel, A.D., et al., *Ghrelin stimulates insulin-induced glucose uptake in adipocytes*. Regul Pept, 2006. **134**(1): p. 17-22.
116. Thompson, N.M., et al., *Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor*. Endocrinology, 2004. **145**(1): p. 234-42.
117. Muccioli, G., et al., *Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor*. Eur J Pharmacol, 2004. **498**(1-3): p. 27-35.
118. Yakabi, K., et al., *Histamine mediates the stimulatory action of ghrelin on acid secretion in rat stomach*. Dig Dis Sci, 2006. **51**(8): p. 1313-21.
119. Sibilias, V., et al., *Intracerebroventricular acute and chronic administration of obestatin minimally affect food intake but not weight gain in the rat*. J Endocrinol Invest, 2006. **29**(11): p. RC31-4.
120. Dornonville de la Cour, C., et al., *Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells*. Regul Pept, 2004. **120**(1-3): p. 23-32.
121. Li, Y., et al., *Ghrelin acts on the dorsal vagal complex to stimulate pancreatic protein secretion*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(6): p. G1350-8.
122. Brzozowski, T., et al., *Exogenous and endogenous ghrelin in gastroprotection against stress-induced gastric damage*. Regul Pept, 2004. **120**(1-3): p. 39-51.
123. Brzozowski, T., et al., *Role of central and peripheral ghrelin in the mechanism of gastric mucosal defence*. Inflammopharmacology, 2005. **13**(1-3): p. 45-62.
124. Katugampola, S.D., Z. Pallikaros, and A.P. Davenport, *[125I-His(9)]-ghrelin, a novel radioligand for localizing GHS orphan receptors in human and rat tissue: up-regulation of receptors with atherosclerosis*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(1): p. 143-9.
125. Nagaya, N., et al., *Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(12): p. 5854-9.

126. Nagaya, N. and K. Kangawa, *Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of chronic heart failure*. Regul Pept, 2003. **114**(2-3): p. 71-7.
127. Hosoda, H., et al., *Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 21995-2000.
128. Iglesias, M.J., et al., *Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes*. Cardiovasc Res, 2004. **62**(3): p. 481-8.
129. Volterrani, M., et al., *Haemodynamic effects of intravenous growth hormone in congestive heart failure*. Lancet, 1997. **349**(9058): p. 1067-8.
130. Amato, G., et al., *Body composition, bone metabolism, and heart structure and function in growth hormone (GH)-deficient adults before and after GH replacement therapy at low doses*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **77**(6): p. 1671-6.
131. Cittadini, A., et al., *Differential cardiac effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in the rat. A combined in vivo and in vitro evaluation*. Circulation, 1996. **93**(4): p. 800-9.
132. Tajima, M., et al., *Treatment with growth hormone enhances contractile reserve and intracellular calcium transients in myocytes from rats with postinfarction heart failure*. Circulation, 1999. **99**(1): p. 127-34.
133. Locatelli, V., et al., *Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat*. Endocrinology, 1999. **140**(9): p. 4024-31.
134. Springer, J., et al., *Prognosis and therapy approaches of cardiac cachexia*. Curr Opin Cardiol, 2006. **21**(3): p. 229-33.
135. Putz R., P.R., *Sobotta - Atlas der Anatomie des Menschen*. Vol. 21. Auflage. 2004: Elsevier Urban & Fischer. 488.
136. Biochain. http://www.biochain.com/biochain/coa/RNA_CoA_BCI.pdf. [cited.
137. Raghay, K., et al., *Ghrelin localization in the medulla of rat and human adrenal gland and in pheochromocytomas*. Histol Histopathol, 2008. **23**(1): p. 57-65.
138. Gualillo, O., et al., *Gender and gonadal influences on ghrelin mRNA levels in rat stomach*. Eur J Endocrinol, 2001. **144**(6): p. 687-90.
139. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
140. Perez, S., et al., *Identifying the most suitable endogenous control for determining gene expression in hearts from organ donors*. BMC Mol Biol, 2007. **8**: p. 114.
141. Alberts B., B.D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. 1999: Wiley-VCH.
142. al., S.S.e., *Essential Echocardiography* 2007. Seite 93.
143. Beiras-Fernandez, A., et al., *Altered myocardial expression of ghrelin and its receptor (GHSR-1a) in patients with severe heart failure*. Peptides. **31**(12): p. 2222-8.
144. Matsumura, K., et al., *Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits*. Hypertension, 2002. **40**(5): p. 694-9.
145. Nagaya, N., et al., *Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors*. Circulation, 2001. **104**(17): p. 2034-8.
146. Okumura, H., et al., *Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous peptide from the stomach*. J Cardiovasc Pharmacol, 2002. **39**(6): p. 779-83.
147. Wiley, K.E. and A.P. Davenport, *Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1*. Br J Pharmacol, 2002. **136**(8): p. 1146-52.
148. Seoane, L.M., et al., *Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely-moving rats*. Eur J Endocrinol, 2000. **143**(5): p. R7-9.

149. Beiras-Fernandez, A., F. Weis, and B. Reichart, *Ghrelin resistance in heart failure or why failing cardiomyocytes do not produce ghrelin: the same problem?* Eur J Heart Fail, 2009. **11**(11): p. 1111; author reply 111.
150. Sirotkin, A.V., et al., *Effect of inhibitor and activator of ghrelin receptor (GHS-R1a) on porcine ovarian granulosa cell functions.* Gen Comp Endocrinol.
151. Wang, F., et al., *Ghrelin reduces rat myocardial calcification induced by nicotine and vitamin D3 in vivo.* Int J Mol Med.
152. Xu, J.P., et al., *Ghrelin improves disturbed myocardial energy metabolism in rats with heart failure induced by isoproterenol.* J Pept Sci. **16**(8): p. 392-402.
153. Pemberton, C.J., et al., *Ghrelin induces vasoconstriction in the rat coronary vasculature without altering cardiac peptide secretion.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(4): p. H1522-9.
154. Li, L., et al., *Cardioprotective effects of ghrelin and des-octanoyl ghrelin on myocardial injury induced by isoproterenol in rats.* Acta Pharmacol Sin, 2006. **27**(5): p. 527-35.
155. Chang, L., et al., *Ghrelin protects myocardium from isoproterenol-induced injury in rats.* Acta Pharmacol Sin, 2004. **25**(9): p. 1131-7.
156. Isgaard, J., A. Barlind, and I. Johansson, *Cardiovascular effects of ghrelin and growth hormone secretagogues.* Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2008. **8**(2): p. 133-7.
157. Nagaya, N., M. Kojima, and K. Kangawa, *Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of cardiopulmonary-associated cachexia.* Intern Med, 2006. **45**(3): p. 127-34.
158. Pineiro, R., et al., *Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes.* FEBS Lett, 2005. **579**(23): p. 5163-9.
159. Sun, Q., et al., *Effects of GH secretagogues on contractility and Ca²⁺ homeostasis of isolated adult rat ventricular myocytes.* Endocrinology. **151**(9): p. 4446-54.
160. Akashi, Y.J., et al., *No effects of human ghrelin on cardiac function despite profound effects on body composition in a rat model of heart failure.* Int J Cardiol, 2009. **137**(3): p. 267-75.
161. Grossini, E., et al., *Intracoronary ghrelin infusion decreases coronary blood flow in anesthetized pigs.* Endocrinology, 2007. **148**(2): p. 806-12.

8. Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
cDNA	aus RNA mittels dem Enzym Reverse Transkriptase erzeugte, dazu komplementäre DNA
CHF	chronische Herzinsuffizienz
EF (=ejection fraction)	Auswurfleistung
eNOS	endotheliale Stickstoffoxid Synthase
GH	Somatotropin
GHRH	GH-Releasinghormon
GHRH-6	Hexarelin
GHS	GH – secretogues
GHS-R	Rezeptor des GHS
GHSR-1a	Rezeptortyp 1a des GHS
HF	Herzfrequenz
HI	Herzinsuffizienz
HPRT-Gen (Primer)	Hypoxanthin-Phosphoribosyl- Transferase Gen (HPRT), Haushaltsgen zum Nachweis von Genexpression
IP ₃	Inositoltriphosphat
LA (=left atrium)	linker Vorhof
LV (=left ventricle)	linker Ventrikel
LVAD	Linksventrikuläre Herzunterstützungssysteme (left ventricular assist devices, LVAD)
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MAP	mean artery pressure; mittlerer arterieller Blutdruck
Myokard	Herzmuskelgewebe
NOS-NO	nitric oxide synthase-nitric oxide

preload	Vorlast, enddiastolisches Ventrikelvolumen
RA (=right atrium)	rechter Vorhof
RV (=right ventricle)	rechter Ventrikel
SVI	Schlagvolumenindex
TBS	Tris Buffered Saline (=Trispuffer)
ZNS	zentrales Nervensystem

9. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN ENDDIASTOLISCHEM FÜLLUNGSDRUCK UND AUSWURFLEISTUNG BEI GESUNDEN UND HERZINSUFFIZIENTEN PATIENTEN (MODIFIZIERT NACH HEROLD, 2006, S.176 [4]).	5
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER FUNKTIONSWEISE DES RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM (MODIFIZIERT NACH [14]).	7
ABBILDUNG 3: DIE REGULATION DER WACHSTUMSFREISETZUNG ÜBER ZWEI VERSCHIEDENE SIGNALKASKADEN (VIA cAMP-ERHÖHUNG UND IP ₃ -FREISETZUNG). MODIFIZIERT NACH KOJIMA, M. AND K. KANGAWA, <i>GHRELIN: STRUCTURE AND FUNCTION</i> . <i>PHYSIOL REV</i> , 2005. 85(2): P. 495-522.	11
ABBILDUNG 4: STRUKTURELLE DIFFERENZIERUNG ZWISCHEN ACETYLIERTEM PEPTID (AKTIVE FORM) UND NICHT AZETYLIERTEM PEPTID (NICHT-AKTIVE FORM). MODIFIZIERT NACH VAN DER LELY ET AL. 2004 [49].	12
ABBILDUNG 5: EFFEKTE VON GHRELIN, ↑ANSTIEG, ↓ABFALL. MODIFIZIERT NACH KOJIMA ET AL [30].	17
ABBILDUNG 6: WIRKUNG VON CHRONISCHER HERZINSUFFIZIENZ AUF DAS KARDIALE SYSTEM UND ANTAGONISTISCHE WIRKUNG VON GHRELIN ALS KOMPENSATIONSMCHANISMUS (MODIFIZIERT NACH NAGAYA 2006) [64].	24
ABBILDUNG 7: ANATOMISCHE ENTNAHMESTELLEN DER GEWEBEPROBEN (MODIFIZIERTE DARSTELLUNG AUS SOBOTTA, ANATOMIEATLAS [135]).	29
ABBILDUNG 8: UNTERSCHIEDE ZWISCHEN GENOMISCHEN DNA-KLONEN UND cDNA-KLONEN [141].	36
ABBILDUNG 10: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DES GHRELINPEPTIDS IN VERSCHIEDENEN ANATOMISCHEN AREALEN, A1-D1: KONTROLLGRUPPE, A2-D2: STUDIENGRUPPE.	42
ABBILDUNG 11: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DES GHRELIN-REZEPTORS IN VERSCHIEDENEN ANATOMISCHEN AREALEN, A1-D1: KONTROLLGRUPPE, A2-D2: STUDIENGRUPPE.	43
ABBILDUNG 12: POSITIVKONTROLLEN IMMUNHISTOCHEMIE	44
ABBILDUNG 13: NEGATIVKONTROLLE IMMUNHISTOCHEMIE	44
ABBILDUNG 14: NICHT SIGNIFIKANT REDUZIERTE GHRELIN mRNA-EXPRESSION IN MYOKARDGEWEBE VON CHF PATIENTEN IM VERGLEICH ZU HERZGESUNDEN VERSUCHSPERSONEN. DIE RNA WURDE AUS MYOKARDGEWEBE AUFBEREITET UND MITTELS QUANTITATIVER RT-PCR DARGESTELLT (IN DREIFACHER AUSFERTIGUNG). GRAPHIK MODIFIZIERT NACH A. BEIRAS-FERNANDEZ [143].	45
ABBILDUNG 15: GHRELIN-REZEPTOR mRNA IN MYOKARDGEWEBE VON CHF PATIENTEN IM VERGLEICH ZU HERZGESUNDEN VERSUCHSPERSONEN. DIE RNA WURDE AUS MYOKARDGEWEBE AUFBEREITET UND MITTELS QUANTITATIVER RT-PCR DARGESTELLT (IN DREIFACHER AUSFERTIGUNG). DIE DATEN WURDEN BEZÜGLICH GADPH UND B2M-mRNA MIT EINEM EFFIZIENZ-KORRIGIERTEN ALGORITHMUS BERECHNET. CHF (N=12) VERSUS GESUNDES MYOKARD (N=5), MITTELWERT ± SEM. DIE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ WURDE MIT DER VERWENDUNG DES MANN-WHITNEY U-TESTS DURCH DIE MONTE-CARLO-KORREKTURFORMEL FÜR KLEINE PROBENANZAHLEN BESTIMMT. GRAPHIK MODIFIZIERT NACH A. BEIRAS-FERNANDEZ [143].	46
ABBILDUNG 16: IMMUNHISTOCHEMISCHE DARSTELLUNG DER EXPRESSION DES GHRELIN-PEPTIDS UND DES GHS-R IM VERGLEICH ZU DEN KONTROLLEN.	47

10. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich gerne allen Beteiligten dieser Arbeit für deren großartige Unterstützung danken, ohne diese die Vollendung nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst gilt mein großer Dank für seine exzellente Betreuung meinem Doktorvater PD Dr. Andres Beiras, seiner freundlichen Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und der Möglichkeit zu diesem Thema eine klinisch-experimentelle Arbeit anzufertigen. Ich danke ihm besonders für die Hilfestellung zur Ausarbeitung dieses Themas und seine tatkräftige Unterstützung in meinen studentischen und beruflichen Belangen. In diesem Rahmen gilt auch mein großer Dank der Pathologie Santiago de Compostella, Spanien, und deren Leiter Professor Andres Beiras Iglesias, für die ermöglichte Kooperation zur Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen. Zudem bedanke ich mich bei den freundlichen und stets hilfsbereiten Damen aus der Transplantationsambulanz des Klinikums Großhadern.

Mein großer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern Klaus und Anita, die mich über meine Schul- und Studienjahre stets gefördert und unterstützt haben, meiner Schwester Katrin, für ihre Hilfe bei allen Tücken mit dem Computer im Allgemeinen und graphischen Hilfestellungen im Speziellen und meiner Großmutter Marianne.

Ich möchte besonders meinem mittlerweile langjährigen Freund Dr. Matthias König danken, der für meine beruflichen und privaten Belange immer ein offenes Ohr hatte und mich mit meinem Doktorvater Andres Beiras bekannt gemacht hat. Ich wünsche ihm weiterhin alles Gute und hoffe, auf ein baldiges Wiedersehen in München oder seiner Wahlheimat Manchester.

Der abschließende Dank gebührt meiner bezaubernden Lebensgefährtin, Marion Schubert, die mich stets liebevoll unterstützt hat und mir mit anregenden fachlichen Diskussionen geholfen hat.

Vielen Dank