

Nesfatyna 1 – nowy hormon uczestniczący w kontroli przyjmowania pokarmu oraz w mechanizmach uszkodzenia i ochrony błony śluzowej żołądka

Nesfatin-1: a new hormone in the control of food intake and the mechanism of damage and protection of gastric mucosa

Aleksandra Szlachcic, Marcin Surmiak, Jolanta Majka, Tomasz Brzozowski

Katedra Fizjologii Uniwersytetu Jagiellońskiego *Collegium Medicum* w Krakowie

Prz Gastroenterol 2012; 7 (6): 339–350
DOI: 10.5114/pg.2012.33041

Słowa kluczowe: nesfatyna 1, gastroprotekcja, stres, prostaglandyny, tlenek azotu.

Key words: nesfatin-1, gastroprotection, stress, prostaglandins, nitric oxide.

Adres do korespondencji: prof. dr hab. n. med. Tomasz Brzozowski, Katedra Fizjologii, Uniwersytet Jagielloński *Collegium Medicum*, ul. Grzegorzewska 16, 31-531 Kraków, tel.: +48 12 421 10 06, e-mail: mpbrzo@cyf-kr.edu.pl

Streszczenie

Nesfatyna 1 jest 82-aminokwasowym peptydem powstałym w wyniku potranslacyjnej hydrolizy N-końcowego fragmentu innego białka *nucleobindin2* (NUCB2), będącego prekursorem dla nesfatyny 1 o rozpoznanej i ustalonej sekwencji aminokwasów, występującej powszechnie wśród ssaków. Interesujący jest fakt, że genową ekspresję peptydowego układu NUCB2/nesfatyna 1 zaobserwowano w przewodzie pokarmowym gryzoni, zwłaszcza w błonie śluzowej szczurzego żołądka, szczególnie w bliskiej lokalizacji komórek neuroendokrynnych części trzonowej odpowiedzialnych m.in. za uwalnianie greliny. Pierwotnie wykryto, że NUCB2 i nesfatyna 1 podawane do komór bocznych mózgu hamują przyjmowanie pokarmu w fazie nocnej u szczurów i że efekt ten jest połączony ze zmniejszeniem masy ciała tych zwierząt, co sugeruje, że nesfatyna 1 jest peptydem anoreksygenicznym, hamującym apetyt. Dalsze badania nad fizjologicznym znaczeniem nesfatyny 1 dowodzą, że podobnie jak w przypadku innych hormonów pobudzających apetyt (np. grelina) czy hamujących apetyt (np. leptyna), peptyd ten odznacza się właściwościami gastroprotekcijnymi i chroni błonę śluzową żołądka przed uszkodzeniami indukowanymi przez czynniki korozyjne oraz mikrokrwawienia wywoływane przez stres. W ten gastroprotekcynny mechanizm działania nesfatyny 1 zaangażowane są układy endogennych prostaglandyn (PG) uwalnianych na drodze aktywacji cyklooksyzgenaz (COX) – COX-1 i COX-2 – oraz tlenku azotu (NO) produkowanego przez enzymy syntaz NO, odpowiedzialne za wzrost żołądkowego przepływu krwi, któremu towarzyszy wzrost stężenia nesfatyny 1 w osoczu. Podsumowując – endogenne PG i NO są mediatorami gastroprotekcji i przekrwienia obserwowanego w błonie śluzowej żołądka

Abstract

Nesfatin-1 is an 82-amino-acid peptide derived from post-translational processing of the N-terminal fragment of nucleobindin 2 (NUCB2), a protein precursor for nesfatin-1, which is highly conserved across mammalian species. The expression of NUCB2/nesfatin-1 has been detected in the stomach, most prominently within ghrelin cells of the rat gastric oxyntic mucosa. The first biological action ascribed to NUCB2 and nesfatin-1 was the reduction of dark-phase food intake with a concomitant reduction in body weight gain when these peptides were injected intracerebroventricularly, suggesting their anorexigenic action in rodents. Studies on the potential physiological importance of nesfatin-1 have shown that nesfatin-1, similarly as for other appetite peptides such as ghrelin and leptin studied before, exerts protective activity against gastric mucosal lesions induced by topical damaging agents and seems to be also effective against those caused by stress. This gastroprotective action of exogenous nesfatin-1 may involve the activation of PG/COX and NO/NOS systems, resulting in an increase in gastric blood flow accompanied by a rise in plasma nesfatin-1 levels. Thus, it is concluded that 1) endogenous PG and NO may mediate the nesfatin-1-induced gastroprotection in the rat stomach, and 2) clinical studies regarding the potential benefit of nesfatin-1 observed in animals should shed more light on the efficacy of this peptide to prevent gastric disorders including the formation of gastric microbleeding in humans.

szczurów pod wpływem nesfatyny 1. Dlatego autorzy sądzą, że dalsze badania, zwłaszcza kliniczne, mające na celu poznanie mechanizmu działania i wyjaśnienie roli nesfatyny 1 w przewodzie pokarmowym powinny rzucić nieco więcej światła na problem potencjalnego terapeutycznego wykorzystania tego peptydu w zapobieganiu uszkodzeniom żołądka, w tym mikrorzwawieniom żołądkowym u ludzi.

Odkrycie nesfatyny 1 i jej udział w ośrodkowej i obwodowej regulacji przyjmowania pokarmu

Przyjmowanie pokarmu jest kontrolowane przez liczne substancje peptydowe produkowane w komórkach zlokalizowanych nie tylko w różnych obszarach układu nerwowego, lecz także w tkankach obwodowych, w tym w komórkach endokrynych przewodu pokarmowego [1–3]. Pomiedzy peptydami regulującymi przyjmowanie pokarmu zachodzą interakcje, a mechanizm ich działania ma charakter bezpośredniego wpływu na podwzgórze i pień mózgu, gdzie zlokalizowane są ośrodki głodu i sytości, lub działania pośredniego poprzez aktywację aferentnych zakończeń włókien nerwów błędnych. Wśród białek sygnałowych wyróżnia się peptydy wyzwalające głód (hormony oreksygeniczne) oraz peptydy odpowiedzialne za powstanie uczucia sytości (hormony anoreksygeniczne), do których oprócz klasycznych hormonów, takich jak cholecystokinina (CCK) i leptyna, zalicza się również nowo odkrytą nesfatynę 1, opisaną po raz pierwszy w 2006 roku przez Oh-I i wsp. [4].

Na początku lat 90. ubiegłego wieku zidentyfikowano w komórkach ludzkich i mysich białko mające zdolność przyłączania cząsteczek Ca^{2+} i DNA, które nazwano *nucleobindin* lub NEFA (*DNA binding/EF-hand/acidic amino acid rich region*) [1, 2]. W wyniku dalszych badań stwierdzono istnienie dwóch rodzajów tego białka: *nucleobindin1* (NUCB1) oraz *nucleobindin2* (NUCB2) [3]. Cząsteczka NUCB2 ma 24-aminokwasowy peptyd sygnałowy na N-końcu oraz łańcuch składający się z 396 aminokwasów o sekwencji charakteryzującej się niezmiennością u gryzoni i ludzi, co wskazuje na jego znaczenie fizjologiczne w kontroli funkcji przewodu pokarmowego [3, 4]. W wyniku potranslacyjnych przemian cząsteczki NUCB2, w obecności konwertazy prohormonów (PC)-1/3, powstają trzy peptydy: nesfatyna 1 (1–82), nesfatyna 2 (85–163) oraz nesfatyna 3 (166–396) [5].

Dotychczas stwierdzono, że aktywność biologiczną wykazuje jedynie nesfatyna 1, a jej działanie polega na hamowaniu przyjmowania pokarmu u szczurów zarówno po podaniu obwodowym, jak i po podaniu ośrodkowym do komór mózgowych [4, 6]. Stąd też pochodzi nazwa tej cząsteczki, gdyż słowo nesfatyna 1 jest akronimem wyrażenia NUCB2 – *encoded satiety and fat influencing protein* [5]. Początkowo ekspresję mRNA dla

NUCB2 stwierdzono tylko w skupiskach neuronów podwzgórza i pnia mózgu, takich jak: jądro przykomorowe, jądro nadwzrokowe, jądro łukowate, boczna część podwzgórza, *zona incerta* i jądra pasma samotnego [5]. Na podstawie badań immunohistochemicznych okazało się, że w tej samej lokalizacji występuje także nesfatyna 1 [5]. Obecnie wiadomo, że komórki immunopoztywne dla NUCB2/nesfatyny 1 występują także w innych obszarach podwzgórza, śródmózgowia i tyłomózgowia, a mianowicie w grzbietowo-przyśrodkowych jądrach podwzgórza, okolicy guzowatej podwzgórza, jądrze okołokomorowym, jądrze Edingera-Westphala, w miejscu sinawym, jądrach szwu i jądrach grzbietowych nerwów błędnych [6–9]. Ponadto Goebel i wsp. [10] wykazali immunoreaktywne neurony dla nesfatyny 1 w korze wyspy, jądrach migdałowych, brzuszno-bocznej części opuszki i w mózdzku szczura. Obecność nesfatyny 1 wykazano też we współczulnych i przywspółczulnych neuronach przedzwojowych rdzenia kręgowego w odcinku piersiowym, lędźwiowym i krzyżowym [10].

Ciekawe, że nesfatyna 1 występuje wspólnie z innymi neuroprzekaznikami [6–9, 11–13] w obrębie neuronów podwzgórza, w tym przede wszystkim z melatoniną, hormonem koncentrującym melaninę (*melanin-concentrating hormone* – MCH), z białkiem transkryptu kokainowo-amfetaminowego (*cocaine-and amphetamine-regulated transcript* – CART), proopiomelanokortyną (*pro-opiomelanocortin* – POMC), hormonem melanotropowym (α -*melanocyte-stimulating hormone* – α -MSH), z kinazą m-TOR (*mammalian target of rapamycin*), wazopresyną, oksytocyną, neuropeptydem Y (NPY), somatostatyną, hormonem uwalniającym hormon wzrostu (*growth hormone-releasing hormone* – GHRH), hormonem uwalniającym tyreotropinę (*thyrotropin-releasing hormone* – TRH), hormonem uwalniającym kortykotropinę (*corticotropin-releasing factor* – CRF) i neurotensyną [6–9, 11–13]. Ponadto w neuronach jądra Edingera-Westphala nesfatyna 1 występuje razem z acetylocholiną i urokortyną 1, a w neuronach rdzenia przedłużonego razem z serotoniną [7, 13]. Anatomiczna lokalizacja neuronów wykazujących ekspresję nesfatyny 1 oraz jej współwystępowanie z innymi neurotransmiterami sugeruje, że fizjologiczna rola nesfatyny 1 dotyczy nie tylko regulacji przyjmowania pokarmu, lecz także regulacji

neuroendokrynej oraz autonomicznej kontroli narządów wewnętrznych i reakcji popędowo-emocjonalnych.

W związku z tym, że nesfatyna 1 jest obecna wyłącznie w cytoplazmie ciał neuronów mózgowych oraz że nie występuje w żyłakowatościach i zakończeniach aksonów, prawdopodobne jest, że działa jako przekaźnik wewnątrzkomórkowy [6, 7, 10, 11]. Jednak ciała neuronów także mają własności wydzielnicze [14, 15], a więc nie jest wykluczone, że nesfatyna 1 może również działać jako przekaźnik zewnątrzkomórkowy. Te przypuszczenia zostały potwierdzone ostatnimi badaniami, w których wykazano obecność nesfatyny 1 w ziarnistościach wydzielniczych neuronów w obszarze jądra przykomorowego u gryzoni [11].

Większość peptydów biorących udział w regulacji przyjmowania pokarmu obecnych w komórkach mózgowych ma także pochodzenie obwodowe, a ich źródłem jest przede wszystkim przewód pokarmowy. Dotyczy to również nesfatyny 1. Badania doświadczalne u szczurów dowiodły obecności mRNA dla NUCB2 w błonie śluzowej żołądka, przy czym ekspresja preproNUCB2 w komórkach okładzinowych żołądka jest około 20 razy większa niż w neuronach mózgu oraz około 12 razy przewyższa ekspresję tego czynnika w porównaniu z innymi narządami, np. sercem [16]. W szeregu przeprowadzonych badań udokumentowano obecność układu NUCB2/nesfatyna 1 w komórkach błony śluzowej żołądka u szczurów. W żołądku szczurów obecność układu NUCB2/nesfatyna 1 stwierdza się przede wszystkim w komórkach dokrewnych podobnych do X/A (tzw. X/A-like cells). Przypuszcza się, że podobną lokalizacją komórkową odznacza się inny peptyd – grelina, związany z regulacją przyjmowania pokarmu o przeciwnym niż nesfatyna 1 działaniu oreksygenicznym, przy czym obecność nesfatyny 1 potwierdzono metodami immunocytochemicznymi w innych subpopulacjach pęcherzyków komórkowych w porównaniu z greliną [16]. Obecność NUCB2/nesfatyny 1 rozpoznano także w komórkach wysp Langerhansa trzustki, jąder i przysadki mózgowej [16]. W trzustce ludzi i gryzoni nesfatyna 1 występuje wyłącznie w komórkach β , a jej lokalizacja nie jest powiązana z insuliną [17, 18].

Występowanie nesfatyny 1 razem z greliną czy insuliną w tych samych komórkach żołądka i trzustki sugeruje, że peptydy te mogą współdziałać w kontroli przyjmowania pokarmu i utrzymaniu homeostazy glukozy. Udowodniono ponadto, że nesfatyna 1 przechodzi przez barierę krew–mózg w obu kierunkach, a transport ten nie ulega wysyceniu, co wskazuje, że nesfatyna 1, której źródłem są tkanki obwodowe, także uczestniczy w procesach związanych z kontrolowaniem przyjmowania pokarmu [19, 20].

W badaniach przeprowadzonych przez Oh-I i wsp. [4] wykazano, że spośród grupy nesfatyn jedynie nesfatyna

na 1 podana do komory III mózgu w dawkach pikomolarnych zmniejszała przyjmowanie pokarmu w porze nocnej u szczurów mających swobodny dostęp do pokarmu. Efekt jej działania pojawiał się w ciągu 1–6 godzin od momentu podania. Podobne rezultaty uzyskano u innych gatunków, m.in. u myszy z przewlekłymi przetokami zainstalowanymi w komorze III mózgu [11]. W dalszych badaniach wykazano, że niewielkie dawki nesfatyny 1 podanej do komór bocznych mózgu także hamują przyjmowanie pokarmu w porze nocnej u szczurów ze swobodnym dostępem do pokarmu, chociaż efekty działania tego hormonu pojawiają się później i mają charakter długotrwały [21, 22]. Podanie nesfatyny 1 bezpośrednio do jądra przykomorowego spowodowało pojawienie się skutków jej działania w pierwszych 3 godzinach od momentu iniekcji, natomiast podanie takiej samej dawki do komory IV mózgu lub *cisterna magna* wywołało natychmiastowe i utrzymujące się przez dłuższy czas hamowanie nocnego przyjmowania pokarmu [11, 21]. Zróżnicowana kinetyka działania nesfatyny 1 wskazuje na odmienne miejsca i sposób jej działania w przodomózgowiu i tyłomózgowiu.

Gdy nesfatynę 1 podawano do komór bocznych mózgu w dzień w identycznych dawkach jak w poprzednich badaniach, nie uzyskano redukcji przyjmowania pokarmu u szczurów głodzonych w ciągu nocy [21]. Dopiero w dawkach wielokrotnie większych hormon ten wywołał zmniejszenie przyjmowania pokarmu po okresie głodzenia nocnego. Efekt działania nesfatyny 1 zaobserwowano po 3–5 godzinach od momentu jej podania [22]. Wyniki tych badań sugerują prawdopodobny związek nesfatyny 1 z genami zegara biologicznego lub innymi neuroprzekaźnikami aktywowanymi w porze nocnej rytmu okołodobowego.

Na podstawie niezależnie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że nesfatyna 1 podana do płynu mózgowo-rdzeniowego w małych dawkach (pikomolarnych), podobnie jak do komór mózgu i *cisterna magna* oraz jądra przykomorowego, wywołuje długotrwałe zahamowanie nocnego przyjmowania pokarmu u szczurów mających swobodny dostęp do pokarmu i w mniejszym stopniu ogranicza przyjmowanie pokarmu u tych gryzoni głodzonych w porze nocnej. Co więcej, nesfatyna 1 podana do komory III nie tylko hamuje przyjmowanie pokarmu, lecz także powoduje zmniejszenie masy ciała u szczurów, co wskazuje na jej prawdopodobny udział w procesach związanych z wydatkowaniem energii [5].

W związku z tym, że NUCB2/nesfatyna 1 współwystępuje z innymi peptydami związanymi z kontrolą przyjmowania pokarmu, zrealizowano wiele badań, których celem było stwierdzenie, czy istnieje współdziałanie pomiędzy nesfatyną 1 a tymi substancjami i jakie są

konsekwencje tych interakcji. Na podstawie otrzymanych rezultatów opisano liczne interakcje pomiędzy nesfatyną 1 i innymi hormonami apetytu wyjaśniające anoreksygeniczne działanie nesfatyny 1.

W badaniach *in vitro* stwierdzono, że nesfatyna 1 w sposób bezpośredni na drodze autokrynej lub intrakrynej hamuje neurony jądra łukowatego podwzgórza uwalniające oreksygeniczny neuropeptyd Y (NPY) [23]. Ponadto w neuronach jądra łukowatego podwzgórza immunopozytywnych dla pm-TOR również stwierdzono obecność nesfatyny 1. Być może substancja ta współuczestniczy w zmniejszaniu ekspresji mRNA dla NPY przez szlak powiązany z aktywnością pm-TOR [12, 24]. W odróżnieniu od tych danych okazało się, że działanie nesfatyny 1 nie zależy od centralnych efektów leptyny. Ponadto leptyna podana do komór mózgowych nie wpływa na hamowanie przez nesfatynę 1 nocnego przyjmowania pokarmu [5].

Kolejnym peptydem współdziałającym z nesfatyną 1 w zakresie regulacji przyjmowania pokarmu jest oksytocyna, która podana do komory III mózgu hamuje przyjmowanie pokarmu na drodze niezależnej od leptyny [11]. Stwierdzono, że nesfatyna 1 podana do komór mózgowych pobudza neurony uwalniające oksytocynę w jądrze przykomorowym, a także pobudza jej uwalnianie w warunkach *in vitro* [11]. Stwierdzono również, że szlaki oksytocynoergiczne pomiędzy jądrem przykomorowym a jądrem pasma samotnego są powiązane z anoreksygenicznym działaniem nesfatyny 1, gdyż podanie do komory III antagonistów receptorów oksytocynowych znosi hamujące działanie nesfatyny 1 na przyjmowanie pokarmu [11].

Nesfatyna 1 wywiera swój efekt anoreksygeniczny prawdopodobnie na drodze związanej z receptorami CRF₂ (*corticotropin-releasing factor*), czego dowodem jest podobieństwo skutków jej działania i działania agonisty receptora CRF₂ – urokortyny [25, 26]. Prawdopodobnie interakcja pomiędzy nesfatyną 1 a receptorami CRF₂ dotyczy nie tylko kontroli przyjmowania pokarmu, lecz także może zachodzić podczas reakcji organizmu na stres. Wykazano, że czynniki stresowe, takie jak infekcja bakteryjna czy zabieg chirurgiczny, aktywują neurony uwalniające nesfatynę 1 u szczurów. W przypadku zabiegu chirurgicznego pobudzeniu ulegają neurony zlokalizowane w przedniej części jądra przykomorowego, jądrze Edingera-Westphala, jądrach szlaków katecholaminergicznych i serotonergicznych [27], a w przypadku infekcji – neurony jądra nadwzrokowego, jądra przykomorowego i łukowatego oraz jąder pasma samotnego [28]. Gdy stres ma charakter emocjonalny, wzrasta aktywność sekrecyjna neuronów immunopozytywnych dla nesfatyny 1 w różnych jądrach podwzgórza i tyłomózgowia [13, 29]. Nesfatyna 1 podana dokomoro-

wo w dawkach większych od tych, które hamują nocne przyjmowanie pokarmu, wywiera wpływ na zachowania emocjonalne związane z reakcją na strach [30]. Ponadto stwierdzono obecność neuronów immunoreaktywnych dla nesfatyny 1 w jądrze migdałowatym, które odpowiada za zachowania emocjonalne wywołane strachem i gniewem, co może sugerować udział nesfatyny 1 w tych reakcjach [10, 31]. Związek nesfatyny 1 ze strukturami mózgowymi zaangażowanymi w reakcję organizmu na czynniki stresowe różnego pochodzenia może wskazywać na jej udział w zaburzeniach odżywiania wynikających ze stresu.

Ekspresja NUCB2/nesfatyny 1 w podwzgórzu wykazuje zróżnicowanie w zależności od aktualnego stanu metabolicznego, co wydaje się potwierdzać fizjologiczne znaczenie tego układu w kontroli przyjmowania pokarmu. Ekspresja mRNA NUCB2 w jądrze przykomorowym oraz nadwzrokowym maleje po 24-godzinnym okresie głodzenia, a następnie ulega normalizacji po podaniu pożywienia [5, 9]. Podobnie dzieje się z aktywnością neuronów immunopozytywnych dla nesfatyny 1, która wzrasta po karmieniu poprzedzonym 24-godzinnym głodzeniem [21]. Te dane wskazują na związek pomiędzy aktywnością tych neuronów a stanem sytości, przy czym zmiana ekspresji NUCB2/nesfatyny 1 w zależności od warunków metabolicznych jest specyficzna dla podwzgórza, ale nie dla jądra Edingera-Westphala [32]. Wykazano ponadto, że ekspresja mRNA NUCB2 wzrasta pod wpływem substancji anoreksygenicznych, takich jak agoniści receptora dla serotoniny 5-HT_{1B/2C} lub α -MSH [5, 33]. Cholecystokinina (CCK) podana dootrzewnowo aktywuje komórki dla nesfatyny 1 w jądrze przykomorowym i w jądrze pasma samotnego, co wskazuje na pośredniczący udział nesfatyny 1 pochodzenia centralnego w aktywacji uczucia sytości wywołanego przez peptydy jelitowe [21]. Anatomiczna dystrybucja komórek, w których stwierdzono obecność NUCB2/nesfatyny 1, oraz współobecność w tych komórkach innych neurotransmiterów wskazują, że nesfatyna 1 jest nie tylko kolejnym peptydem regulującym przyjmowanie pokarmu, lecz także bierze udział w mechanizmach związanych z reakcjami popędowo-emocjonalnymi, neuroendokrynnymi oraz odpowiedzialnymi za kontrolowanie funkcji narządów wewnętrznych.

Nesfatyna 1 – nowy czynnik gastroprotekcyny o potencjalnym znaczeniu w mechanizmie utrzymania integralności błony śluzowej żołądka. Znaczenie endogennych prostaglandyn i tlenu azotu

Dotychczas nie ma przekonujących informacji, czy nesfatyna 1 może uczestniczyć w mechanizmach zapew-

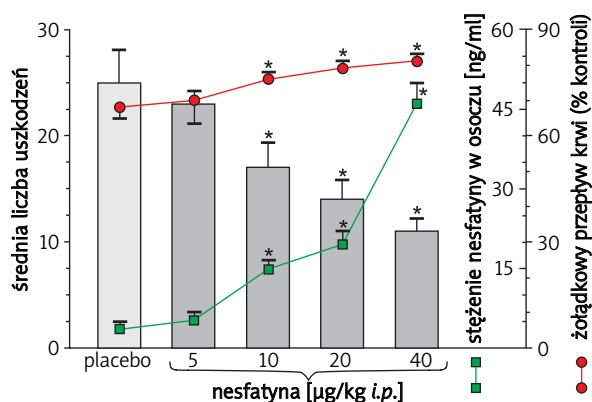
niających integralność błony śluzowej żołądka. We wcześniejszych badaniach, głównie doświadczalnych, wykazano, że peptydy regulujące przyjmowanie pokarmu u ludzi, a więc zarówno leptyna, jak i grelina, podawane obwodowo lub centralnie do komór bocznych mózgu mają właściwości gastroprotecyjne i chronią błonę śluzową żołądka przed uszkodzeniami wywołanymi przez etanol, niedokrwienie z reperfuzją lub powstałymi w wyniku stresu. Mechanizm tej gastroprotekcji nie jest do końca poznany, chociaż podkreśla się możliwość aktywowania przez te hormony szlaku endogennych prostaglandyn (PG) i tlenku azotu (NO), znanych czynników cytoprotekcyjnych wzmacniających poszczególne mechanizmy bariery śluzówkowej, w tym przepływu krwi, wydzielania ochronnego śluzu i wodorowęglanów oraz hamowania stresu oksydacyjnego. Celem fragmentu tych badań przedstawionego w prezentowanym artykule poglądowym była odpowiedź na pytanie, czy nesfatyna 1 wykazuje działanie gastroprotecyjne objawiające się ochroną błony śluzowej uszkodzanej w następstwie narażenia zwierząt na doświadczalny stres oraz zbadanie, czy w tym ochronnym działaniu nesfatyny 1 uczestniczą PG i NO. W badaniach na szczurach podjęto próbę odpowiedzi na pytanie o udział nesfatyny 1 w procesach ochronnych i naprawczych błony śluzowej żołądka. Początkowo wykorzystano doświadczalny model uszkodzeń błony śluzowej żołądka wywołanych przez narażenie tych zwierząt na stres wynikający z ich 3,5-godzinnej unieruchomienia i oziębienia. W tym modelu uszkodzenia stresowe powstałe w wyniku synergizmu obniżonej temperatury i unieruchomienia zostały wywołane metodą opisaną wcześniej przez Takagi i Okabe, stosowaną od lat w Katedrze Fizjologii Uniwersytetu Jagiellońskiego *Collegium Medicum* [34, 35]. Szczury umieszczono w specjalnych klatkach typu Bolmana zapewniających ich unieruchomienie, a następnie zanurzono w wodzie o temperaturze 23°C, tak aby poziom wody sięgał do wyrostka mieczykowatego mostka każdego zwierzęcia. Protokół badania zakładał, że zwierzęta otrzymały nesfatynę 1 lub placebo (0,9% NaCl) 30 min przed zastosowaniem czynnika uszkodzającego. Nesfatynę 1 podano dootrzewnowo w zwiększających się dawkach, odpowiednio od 5 µg/kg m.c., 10 µg/kg m.c., 20 µg/kg m.c. do 40 µg/kg m.c. Część zwierząt otrzymała nesfatynę 1 bezpośrednio do komory prawej mózgu w jednorazowej dawce, zaczynając od 1 ng, a kończąc na 1000 ng.

Zarówno zwierzęta, które otrzymały nesfatynę 1, jak i placebo, zostały podzielone na dalsze grupy badawcze w celu określenia interakcji pomiędzy podanymi substancjami i czynnikami gastroprotekcyjnymi, takimi jak endogenne PG i NO. W grupie A podano dootrzewnowo nieselektywny inhibitor cyklooksygenaz (COX) – COX-1

i COX-2 – indometacynę w dawce 5 mg/kg m.c., która – jak stwierdzono w poprzednio przeprowadzonych badaniach – hamuje w około 90% syntezę PGE₂ w błonie śluzowej, jednocześnie nie powodując makroskopowych uszkodzeń błony śluzowej żołądka [35, 36]. W kolejnych grupach badawczych – B i C – zastosowano oddzielnie selektywne inhibitory obu izoform enzymatycznych COX-1 i COX-2. Dla zahamowania aktywności COX-1 zastosowano związek SC-560 podany dożołądkowo w dawce 10 mg/kg m.c., a dla COX-2 – rofekoksyb podany dożołądkowo w dawce 10 mg/kg m.c. Dawki podanych inhibitorów zostały dobrane na podstawie wyników uzyskanych we wcześniejszych doświadczeniach, tak aby całkowicie hamowały uwalnianie endogennej PGE₂ [37, 38]. Inhibitory COX podano około 30 min przed zastosowaniem nesfatyny 1 w standardowej dawce 20 µg/kg m.c. dootrzewnowo. Ponadto część zwierząt otrzymała inhibitory COX w kombinacji z egzogenną PGE₂ podaną w dawce 5 mg/kg m.c. dożołądkowo w celu uzupełnienia deficytu endogennych PG na skutek stosowania tych inhibitorów. Szczurom z grup kontrolnych podano dożołądkowo lub dootrzewnowo 0,9% NaCl.

W celu zbadania współdziałania NO i nesfatyny 1 w procesach gastroprotekcji grupa zwierząt otrzymała inhibitor enzymu syntazy NO – związek N^G-nitro-L-argininę, podany dootrzewnowo w dawce 20 mg/kg m.c. [39]. Ponadto jednej z grup zwierząt doświadczalnych podano L-argininę, która jest substratem dla syntazy NO wraz z kombinacją L-NNA i nesfatyny 1. We wszystkich grupach doświadczalnych po zastosowaniu narkozy ogólnej mierzono żołądkowy przepływ krwi i oceniano uszkodzenia błony śluzowej żołądka, wykorzystując metodę planimetryczną. Ponadto mierzono stężenie nesfatyny 1 w osoczu metodą radioimmunologiczną (*radioimmunoassay* – RIA), stosując znakowane przeciwciała. W celu określenia udziału endogennych PG w gastroprotekcyjnym działaniu nesfatyny 1 mierzono stężenie endogennej prostaglandyny E₂ (PGE₂) w pobranych biopatach śluzówki żołądka metodą RIA oraz oznaczano stężenie NO uwalnianego do treści żołądka, wykorzystując stężenie azotanów i azotynów zgodnie z wcześniejszymi wynikami badań [40, 41].

Jak pokazano na rycinie 1., porównano wielkość przepływu krwi w grupie kontrolnej i w grupach, w których zwierzęta przed zadziałaniem czynnika uszkodzającego otrzymały dootrzewnowo nesfatynę 1 podawaną w zwiększających się dawkach, odpowiednio 5 µg/kg m.c., 10 µg/kg m.c., 20 µg/kg m.c. i 40 µg/kg m.c. Podanie dootrzewnowe nesfatyny 1 spowodowało nie tylko wzrost przepływu krwi przez śluzówkę żołądka, lecz także statystycznie istotne zmniejszenie liczby uszkodzeń śluzówki zależne od dawki peptydu. Liczba



Ryc. 1. Wpływ nesfatyny 1 na liczbę uszkodzeń w błonie śluzowej żołądka poddanej działaniu czynnika uszkodzającego, którym był stres, jak również na towarzyszące tym efektom zmiany żołądkowego przepływu krwi oraz stężenia nesfatyny 1 w osoczu mierzonego metodą radioizotopową (RIA) za pomocą znakowanych przeciwciał. Nesfatin-1 podana dootrzewnowo (*i.p.*) w sposób zależny od dawki zmniejszyła stopień nasilenia uszkodzeń błony śluzowej żołądka oraz spowodowała wzrost żołądkowego przepływu krwi, wyrażonego jako procent przepływu krwi w stosunku do wartości tego przepływu u zwierząt kontrolnych otrzymujących placebo (0,9% NaCl) i poddanych działaniu stresu. Wraz ze zmniejszeniem liczby uszkodzeń stresowych i wzrostem żołądkowego przepływu krwi zaobserwowano statystycznie znamienne wzrost stężenia nesfatyny 1 w osoczu

Wyniki przedstawiono w postaci średnich \pm SEM z 3 doświadczeń na 6–8 osobnikach w każdej grupie; *znamienna statystycznie ($p < 0,05$) różnica w stosunku do grupy otrzymującej placebo

Fig. 1. The effect of exogenous administration of nesfatin-1 on the mean number of water immersion and restraint stress-induced gastric lesions and the accompanying changes of gastric blood flow and plasma nesfatin-1 levels measured by radioimmunoassay (RIA) using a specific labelled antibody. Nesfatin-1 given intraperitoneally (*i.p.*) decreased in a dose-dependent manner the severity of the gastric lesions induced by WRS and significantly increased the plasma nesfatin-1 and GBF expressed as a percentage of blood flow compared to the value of the flow in control animals treated with placebo (0.9% NaCl) with or without exposure to WRS

Results are presented as mean \pm SEM of three experiments on 6–8 rats per each group, * $p < 0.05$ vs. placebo group

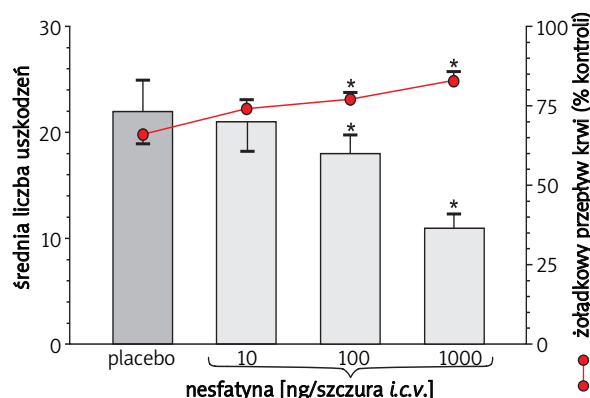
uszkodzeń krwotocznych o typie nadżerek wywołanych stresem wyraźnie się zmniejszyła u szczurów, które otrzymały nesfatynę 1. Pod wpływem nesfatyny 1 statystycznie znamienne zmniejszyła się liczba uszkodzeń wywołanych przez stres w porównaniu z grupą kontrolną, czemu towarzyszył wzrost żołądkowego przepływu krwi. Ponadto gastroprotekcji uzyskanej pod wpływem nesfatyny 1 towarzyszył wzrost stężenia endogennej nesfatyny 1 w osoczu. Sprawdzono również, czy nesfatin-1 jest skuteczna w gastroprotekcji po jej podaniu centralnym do prawej komory mózgu. Okazało się, że w grupie zwierząt poddanych centralnemu działaniu nesfatyny 1, podobnie jak pokazano to na rycinie 1, wzrost przepływu krwi przez błonę śluzową żołądka oraz mniejszy był stopień uszkodzenia śluzówki (ryc. 2). Uzyskany efekt ochronny pod wpływem nesfatyny 1 w widoczny sposób zależał od zastosowanej dawki. Największą redukcję uszkodzeń i wzrost przepływu krwi uzyskano po podaniu nesfatyny 1 w jednorazowej dawce 1000 ng. U zwierząt, które otrzymały dawkę 100 razy mniejszą, wartość przepływu krwi i powierzchnia uszkodzeń błony śluzowej osiągnęły wartości porównywalne z tymi otrzymanymi w grupie kontrolnej.

Niektóre hormony kontrolujące apetyt, takie jak grelina czy oreksyna-A, mogą działać poprzez szlak PG i dlatego badano wpływ blokowania aktywności COX-1 i COX-2 na wielkość przepływu krwi i stopień uszkodzenia śluzówki żołądka u szczurów otrzymujących nesfatynę 1 poddanych działaniu stresu. Podanie nesfatyny 1 w dawce 20 µg/kg m.c. przed zadziałaniem stresu, w podobny sposób jak pokazano na rycinie 1, powoduje znaczące zmniejszenie liczby uszkodzeń oraz wzrost przepływu krwi w śluzówce żołądka w porównaniu ze zwierzętami otrzymującymi placebo dootrzewnowo (ryc. 3.). Jeżeli szczurom narażonym na działanie stresu zaaplikowano preparaty hamujące w sposób selektywny lub nieselektywny aktywność COX-1 i COX-2, to skutki uszkodzenia śluzówki żołądka oraz zmniejszenie przepływu krwi były znacząco większe w porównaniu z grupą, w której zastosowano wyłącznie czynnik stresowy. Indometacyna, nieselektywny inhibitor izoenzymów COX-1 i COX-2, spowodowała najbardziej nasilone zmiany. U szczurów z zablokowaną aktywnością enzymów szlaku syntezy endogennych prostaglandyn (PGE_2) w śluzówce żołądka, którym podano nesfatynę 1, stwierdzono statystycznie znamienne zwiększenie indeksu uszkodzeń oraz obniżenie przepływu krwi w porównaniu z grupą zwierząt otrzymujących jedynie nesfatynę 1. Na rycinie 3. przedstawiono wyniki doświadczeń, w których oceniano powierzchnię uszkodzeń śluzówki żołądka oraz wielkość żołądkowego przepływu krwi u zwierząt, które poddano działaniu stresu i inhibitorów COX-1 i COX-2. Najbardziej efekty te były widoczne w przy-

padku podania indometacyny w kombinacji z nesfatyną 1, gdzie obserwowano największy stopień zahamowania ochronnego działania tego peptydu. U zwierząt, którym podano w kombinacji nesfatynę 1 i selektywny inhibitor COX-1 (SC-560), stwierdzono natomiast najmniejszy stopień odwrócenia protekcyjnego działania nesfatyny 1. Na rycinie 3. przedstawiono również wpływ dootrzewnowego podania nesfatyny 1 w dawce 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c. w kombinacji z egzogenną PGE_2 w dawce 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c. zastosowaną dożołądkowo w obecności inhibitorów aktywności COX-1 i COX-2, związków SC-560 i rofekoksyb. W tych grupach doświadczalnych działanie protekcyjne nesfatyny 1 zostało przywrócone przez podanie egzogennej PGE_2 , co objawiało się zmniejszeniem liczby uszkodzeń śluzówki i wzrostem żołądkowego przepływu krwi w odniesieniu do kontroli. Podobnie jak poprzednio najlepsze efekty PGE_2 obserwowano, gdy była ona podawana w kombinacji z wybiórczym inhibitorem aktywności COX-1, SC-560, w mniejszym stopniu działanie ochronne nesfatyny 1 obserwowano w grupach, w których podano ten peptyd w kombinacji z rofekoksybem – selektywnym inhibitorem COX-2. Wyniki tych badań świadczą o tym, że endogenne PG mogą pośredniczyć w gastroprotekcyjnym działaniu nesfatyny 1.

Wpływ nesfatyny 1 na uszkodzenia wywołane stresem i zmiany w żołądkowym przepływie krwi w warunkach zablokowania aktywności syntazy tlenu azotu

Na rycinie 4. pokazano, że w przypadku działania stresu i stosowania inhibitora syntazy NO, związku L-NNA podanego dootrzewnowo w dawce 20 mg/kg m.c., liczba uszkodzeń błony śluzowej żołądka jest zdecydowanie większa w stosunku do grupy otrzymującej placebo. W tych warunkach, gdy blokowana jest synteza NO przez L-NNA, stwierdza się nie tylko tendencję do wzrostu powierzchni uszkodzeń, lecz także znamienne zmniejszenie żołądkowego przepływu krwi. Nesfatyna 1 zastosowana dootrzewnowo w dawce 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c. nie tylko zmniejszyła skutki uszkodzającego działania samego stresu, lecz także skutki poprzedzającego stres działania inhibitora syntazy NO. W celu udowodnienia roli NO w gastroprotekcyjnych działaniach nesfatyny 1 podawano łącznie L-NNA z substratem dla syntazy NO – aminokwasem L-argininą. Najsilniejsze ochronne działanie nesfatyny 1 w stosunku do śluzówki żołądka było widoczne, gdy została ona podana razem z substratem syntazy NO, L-argininą, w obecności L-NNA. W grupie otrzymującej L-argininę zmniejszenie przepływu krwi i stopień uszkodzenia śluzówki żołądka były najmniejsze w porównaniu z grupą poddaną działaniu stresu



Ryc. 2. Wpływ nesfatyny 1 na błonę śluzową żołądka poddaną działaniu czynnika uszkodzającego, którym był stres, i towarzyszące tym efektom zmiany żołądkowego przepływu krwi. Nesfatyna 1 podana do prawej komory bocznej mózgu (*i.c.v.*) w sposób zależny od dawki zmniejszyła stopień nasilenia uszkodzeń błony śluzowej żołądka oraz spowodowała wzrost żołądkowego przepływu krwi, wyrażonego jako procent przepływu krwi w stosunku do wartości tego przepływu u zwierząt kontrolnych otrzymujących placebo (0,9% NaCl) i poddanych działaniu stresu

Wyniki przedstawiono w postaci średnich \pm SEM z 3 doświadczeń na 6–8 osobnikach w każdej grupie; *znamienna statystycznie ($p < 0,05$) różnica w stosunku do grupy otrzymującej placebo

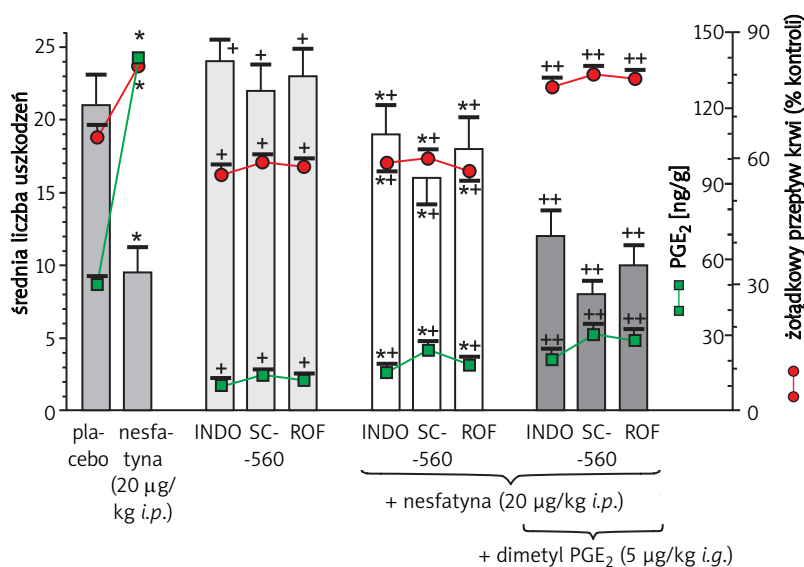
Fig. 2. Effect of intracerebroventricular (*i.c.v.*) administration of nesfatin-1 on stress-induced gastric lesions and the accompanying changes in gastric blood flow. Nesfatin-1 given *i.c.v.* to the right lateral brain ventricle reduced in a dose-dependent manner the severity of stress-induced gastric damage while causing an increase in gastric blood flow

Results are presented as mean \pm SEM of three experiments of 6–8 individuals per group, * $p < 0.05$ vs. placebo group.

oraz L-NNA w obecności nesfatyny 1. Analizując stężenie NO w soku żołądkowym w powyższych grupach badawczych, stwierdzono, że było ono największe w grupie, która otrzymała nesfatynę 1 i L-argininę przed działaniem stresu, a najmniejsze u zwierząt, u których stres połączone jedynie z podaniem L-NNA bez L-argininy (ryc. 4.).

Nesfatyna 1 – czy tylko nowy hormon hamujący apetyt?

Prekursorem nesfatyny 1 jest białko preproNUCB2 (*nucleobindin2*) występujące nie tylko w komórkach



Ryc. 3. Wpływ nesfatyny 1 podanej dootrzewnowo (*i.p.*) w jednorazowej dawce 20 µg/kg m.c. na liczbę uszkodzeń błony śluzowej żołądka, zmiany w żołądkowym przepływie krwi oraz w poziomie generacji PGE₂ przez błonę śluzową żołądka w wyniku działania stresu w warunkach zahamowania syntezy endogennych prostaglandyn przez selektywne inhibitory COX-1 (SC-560 10 mg/kg *i.g.*), COX-2 (rofekoksyb 10 mg/kg *i.g.*) oraz nieselektywny inhibitor COX-1 i COX-2, indometacynę (5 mg/kg *i.p.*)

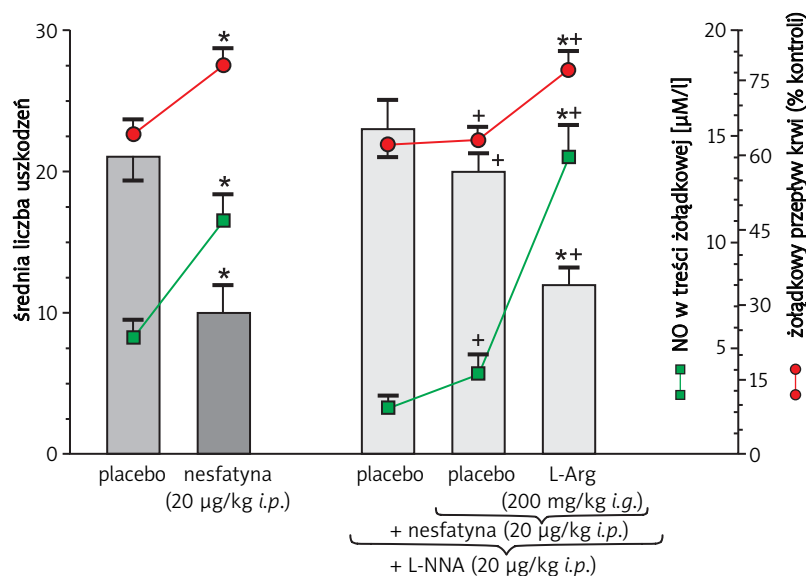
Wyniki przedstawiono w postaci średnich ± SEM z 3 doświadczeń na 6–8 osobnikach w każdej grupie; *znamienna statystycznie ($p < 0,05$) różnica w stosunku do grupy kontrolnej otrzymującej placebo; +znamienna statystycznie ($p < 0,05$) różnica w stosunku do grupy otrzymującej placebo bez podawania nesfatyny 1; **znamienna statystycznie ($p < 0,05$) różnica w stosunku do grupy z podawaną nesfatyną 1 bez kombinacji z inhibitorami COX-1 i COX-2; +++znamienna statystycznie ($p < 0,05$) różnica w stosunku do grupy otrzymującej nesfatynę 1 w kombinacji z inhibitorami COX-1 i COX-2

Fig. 3. Influence of nesfatin-1 administered in a single dose of 20 mg/kg on the mean number of stress-induced gastric lesions and corresponding changes in the gastric blood flow and the gastric mucosal generation of PGE₂ in rats with or without concurrent treatment with SC-560 (10 mg/kg *i.g.*), a selective inhibitor of COX-1, rofecoxib (10 mg/kg *i.g.*), a selective inhibitor of COX-2, and indomethacin (5 mg/kg *i.p.*), a non-selective inhibitor of COX-1 and COX-2 activity, respectively

The results are presented as mean ± SEM of three experiments of 6–8 individuals in each group, * $p < 0.05$ vs. placebo, + $p < 0.05$ vs. placebo without nesfatin-1, ** $p < 0.05$ vs. nesfatin-1 alone, +++ $p < 0.05$ vs. nesfatin-1 combined with selective and non-selective inhibitors COX-1 and COX-2 activity

ludzkich, lecz także u gryzoni oraz innych kręgowców niebędących ssakami [42]. Na podstawie badań stwierdzono obecność NUCB2/nesfatyny 1 w komórkach ośrodkowego układu nerwowego [6–10, 12] oraz w różnorodnych tkankach obwodowych, m.in. przewodu pokarmowego [16–18]. Występowanie układu NUCB2/nesfatyna 1 w komórkach dokrewnych i adipocytach sugeruje, że układ ten uczestniczy w kontroli wielu procesów homeostatycznych, w tym regulacji metabolizmu i wydatku energetycznego. Potwierdzają to wyniki badań przeprowadzonych na myszach, w których stwierdzono, że nesfatyna 1, podobnie jak inne hormony przewodu pokarmowego kontrolujące przyjmowanie pokarmu, w tym leptyna i grelina, ma zdolność do przechodzenia przez barierę krew–mózg w obu kierunkach [19, 20]. Ostatnie badania sugerują istnienie podobnych mechanizmów u ludzi [43].

Pierwszym opisanym efektem biologicznego działania nesfatyny 1 podawanej przewlekle do komory III mózgu było zmniejszenie nocnego przyjmowania pokarmu u szczurów oraz redukcja masy ciała i tkanki tłuszczowej [4]. Ostatnio otrzymane wyniki analizy wzorca pokarmowego u myszy wskazują, że anoreksygeniczne działanie nesfatyny 1 wynika z wywołania uczucia sytości (redukcja wielkości porcji pożywienia) oraz uczucia sytości (zmniejszenie częstości przyjmowania posiłków oraz wydłużenie przerw pomiędzy nimi) obserwowanych w ciągu pierwszych 4 godzin w porze nocnej po podaniu nesfatyny 1 do komory bocznej mózgu [44]. Hamowanie przyjmowania pokarmu wywołane przez nesfatynę 1 nie zależy od mechanizmów związanych z leptyną [4, 11, 33]. Stwierdzono, że nesfatyna 1 pośredniczy w aktywacji kaskad mózgowych receptorów CRF₂, melanokortyny_{3/4} oraz oksytocyny [25, 45].



Ryc. 4. Efekt blokady syntazy tlenu azotu (NO) przez zastosowanie związku L-NNA bez nesfatyny 1 i w kombinacji z nesfatyną 1 podawaną dootrzewnowo (*i.p.*) w standardowej dawce 20 µg/kg m.c. na liczbę stresowych uszkodzeń błony śluzowej żołądka oraz towarzyszące zmiany w żołądkowym przepływie krwi i w poziomie NO w treści żołądkowej. L-NNA osłabiała gastroprotecyjne działanie nesfatyny 1 i znacząco redukowało towarzyszący tej protekcji wzrost żołądkowego przepływu krwi oraz poziom NO w świetle żołądka. Częściowo te efekty były niwelowane przez zastosowanie L-argininy, która jest substratem dla syntazy NO, podawanej w jednorazowej dawce 200 mg/kg m.c. dożołądkowo (*i.g.*) w kombinacji z L-NNA

Wyniki przedstawiono w postaci średnich ± SEM z 2 doświadczeń na 6–8 osobnikach w każdej grupie; *znamienna statystycznie ($p < 0,05$) różnica w stosunku do grupy otrzymującej placebo; +znamienna statystycznie ($p < 0,05$) różnica w stosunku do grupy otrzymującej nesfatynę 1; **znamienna statystycznie ($p < 0,05$) różnica w stosunku do grupy otrzymującej nesfatynę 1 w kombinacji z L-NNA

Fig. 4. The effect of inhibition of nitric oxide synthase (NO) activity with L-NNA administered with or without nesfatin-1 (20 µg/kg *i.p.*) on the number of WRS-induced gastric mucosal lesions and the accompanying changes in the GBF and gastric luminal content of NO. L-NNA diminished the gastroprotective activity of nesfatin-1 and significantly reduced the nesfatin-1-induced increase in GBF and gastric luminal content of NO and these effects were reversed by concurrent treatment with L-arginine, a substrate for NO synthase, administered in a single dose of 200 mg/kg (*i.g.*) in combination with L-NNA in the presence of nesfatin-1

The results are presented as mean ± SEM of three experiments on 6–8 individuals in each group, * $p < 0.05$ vs. placebo group, + $p < 0.05$ vs. nesfatin-1, ** $p < 0.05$ vs. nesfatin-1 combined with L-NNA without L-arginine pre treatment

W związku z tym, że niedawno odkryte peptydy kontrolujące przyjmowanie pokarmu, takie jak leptyna i grelina, mają szeroki zakres działania powiązany z czynnościami przewodu pokarmowego, podjęto próbę wyjaśnienia, czy również nesfatyna 1 wpływa na integralność błony śluzowej żołądka. Wyniki przedstawionych w tej pracy badań sugerują, że nesfatyna 1, peptyd kontrolujący przyjmowanie pokarmu, cechuje się właściwościami gastroprotekcijnymi w odniesieniu do błony śluzowej żołądka narażonej na uszkodzające działanie stresu. Nesfatyna 1 podana dootrzewnowo lub ośrodkowo do prawej komory mózgu wywołała, w sposób zależny od dawki, wzrost przepływu krwi przez błonę śluzową

żołądka i zmniejszyła stopień nasilenia uszkodzeń w porównaniu z grupą kontrolną.

Okazuje się, że nesfatyna 1 podana do komór bocznych mózgu wpływa na wiele funkcji fizjologicznych przewodu pokarmowego, w tym m.in. hamuje opróżnianie żołądka u szczurów i myszy oraz zwalnia aktywność motoryczną przewodu pokarmowego u myszy [46, 47]. Obecność nesfatyny 1 stwierdzono w trzustkowych komórkach u ludzi i gryzoni, zwłaszcza w komórkach β wysp Langerhansa, co sugeruje jej udział w kontroli poziomu glukozy przez insulinę [17, 18]. Obecne dane wskazują, że nesfatyna 1 pobudza uwalnianie insuliny w odpowiedzi na glikemię oraz zwiększa ekspresję

mRNA dla preproinsuliny w izolowanych wyspach Langerhansa u szczurów i myszy poprzez sygnał wewnątrzkomórkowy związany z napływem Ca^{2+} przez długoterminowe kanały wapniowe typu L [48–50]. Badania *in vivo* potwierdzają ten bezpośredni efekt, zależnego od glukozy, insulinotropowego działania nesfatyny 1 na komórki β , gdyż dożylne podanie nesfatyny 1 zmniejsza stężenie glukozy w osoczu u otyłych myszy z fenotypem db/db oraz u myszy bez cukrzycy i otyłości. Neuroanatomiczna lokalizacja nesfatyny 1 oraz jej własności sugerują, że ten hormon jest uwalniany przez różnorodne czynniki stresowe oraz bierze udział w odpowiedzi na ich działanie. Dowodem na to są reakcje podobne do tych powstających pod wpływem kortykoliberyny, która jest uwalniana pod wpływem centralnie podawanej nesfatyny 1. Dochodzi do aktywacji osi podwzgórze–przysadka–nadnercza, układu sympatycznego, zmian w reakcjach popędowo-emocjonalnych oraz w reakcjach somatycznych w postaci wzrostu ciśnienia krwi i zahamowania opróżniania żołądka [30, 46, 47, 51–56].

We wcześniejszych badaniach stwierdzono, że peptydy kontrolujące przyjmowanie pokarmu, takie jak leptyna, grelina, oreksyna-A czy obestatylna, uczestniczą w mechanizmach warunkujących utrzymanie integralności błony śluzowej żołądka [57], przy czym ich działanie wiąże się z różnorodnymi czynnikami gastroprotekcijnymi, m.in. z endogennymi PG, NO oraz neuropeptydem CGRP uwalnianym z kapsaicynowrażliwych zakończeń aferentnych włókien czuciowych. Prawdopodobnie ochronne działanie nesfatyny 1 w stosunku do błony śluzowej żołądka również wiąże się z powyższymi mechanizmami, o czym świadczą wyniki badań autorów. Upośledzenie biosyntezy endogennych PG przez selektywne i nieselektywne inhibitory cyklooksygenaz – COX-1 i COX-2 – u zwierząt otrzymujących nesfatynę 1 narażonych na uszkodzające działanie stresu spowodowało zmniejszenie przepływu krwi przez błonę śluzową żołądka oraz nasiliło jej uszkodzenia w porównaniu z grupą badawczą, w której zastosowano jedynie nesfatynę 1. Ochronne działanie nesfatyny 1 zostało przywrócone, jeżeli podano ten peptyd razem z egzogenną PGE_2 . Dowodzi to, że nesfatyna 1 chroni błonę śluzową żołądka przed uszkodzającym działaniem stresu prawdopodobnie poprzez aktywację syntezy endogennych prostaglandyn, podobnie jak grelina i oreksyna-A oraz inne peptydy głodu i sytości. Z przedstawionych w tej pracy badań wynika jednak, że metabolity kwasu arachidonowego nie są jedynymi substancjami, za których pośrednictwem nesfatyna 1 prowadzi do zmniejszenia skutków działania czynników uszkodzających błonę śluzową żołądka. Alternatywnym czynnikiem protekcyjnym, na który może wpływać nesfatyna 1, jest NO. Panuje przekonanie, że podanie inhibitora syntazy NO – L-NNA –

zwiększa skutki działania stresu na błonę śluzową żołądka pomimo stosowania nesfatyny 1.

Ponadto podanie L-NNA zmniejszyło gastroprotekcyjne działanie nesfatyny 1, ale gdy dodatkowo podano L-argininę będącą substratem NOS, stwierdzono odwrócenie hamującego działania inhibitora syntazy NO. W tych warunkach zaobserwowano ponadto wzrost śluzówkowego przepływu krwi oraz zmniejszenie powierzchni uszkodzeń. Poziom NO w soku żołądkowym był najwyższy w grupie, w której podano nesfatynę 1 i L-argininę. Dodatkowo w naszych nieopublikowanych badaniach molekularnych stwierdzono zmniejszenie ekspresji konstytutywnej syntazy NO (cNOS) i drastyczny wzrost indukowanej postaci (iNOS) pod wpływem stresu. Nesfatyna 1 podana przed zadziałaniem czynnika stresowego spowodowała wzrost ekspresji mRNA dla cNOS oraz widoczny spadek ekspresji mRNA dla iNOS. To wydaje się potwierdzać, że nesfatyna 1 wiąże się nie tylko z endogennymi prostaglandynami, lecz także z NO i dzięki aktywacji tych mechanizmów chroni błonę śluzową żołądka przed działaniem czynników uszkodzających.

Podsumowanie

Przedstawione w tej pracy wyniki badań doświadczalnych sugerują, że działanie ochronne nesfatyny 1 wymaga dobrze zaplanowanych i kontrolowanych badań klinicznych, zwłaszcza pod kątem wyjaśnienia funkcji tego nowego peptydu w mechanizmie gastroprotekcji, i jednocześnie wyniki sugerują potrzebę monitorowania poziomu tego hormonu w nieprawidłowościach górnego odcinka przewodu pokarmowego.

Podziękowania

Praca naukowa finansowana z projektu badawczego Nr. Grantu 4571/B/P01/2010/39 z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Narodowe Centrum Nauki) w latach 2010–2013 (główny autor dr n. med. Aleksandra Szlachcic).

Piśmiennictwo

1. Kanai Y, Tanuma S. Purification of a novel B cell growth and differentiation factor associated with lupus syndrome. *Immunol Lett* 1992; 32: 43-8.
2. Barnikol-Watanabe S, Gross NA, Götz H, et al. Human protein NEFA, a novel DNA binding/EF-hand/leucine zipper protein. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA, isolation and characterization of the protein. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1994; 375: 497-512.
3. Miura K, Titani K, Kurosawa Y, Kanai Y. Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochem Biophys Res Comm* 1992; 187: 375-80.
4. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006; 443: 709-12.

5. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, et al. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 2009; 150: 662-71.
6. Foo KS, Brismar H, Broberger C. Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience* 2008; 156: 563-79.
7. Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, et al. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology* 2007; 148: 5088-94.
8. Fort P, Salvert D, Hanriot L, et al. The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat. *Neuroscience* 2008; 155: 174-81.
9. Kohno D, Nakata M, Maejima Y, et al. Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus co-express oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology* 2008; 149: 1295-301.
10. Goebel M, Stengel A, Wang L, et al. Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neurosci Lett* 2009; 452: 241-6.
11. Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, et al. Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab* 2009; 10: 355-65.
12. Inhoff T, Stengel A, Peter L, et al. Novel insight in distribution of nesfatin-1 and phosphor-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats. *Peptides* 2010; 31: 257-62.
13. Okere B, Xu L, Roubos EW, et al. Restraint stress alters the secretory activity of neurons co-expressing urocortin-1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 in the mouse Edinger-Westphal nucleus. *Brain Res* 2010; 1317C: 92-9.
14. Bustos G, Abarca J, Campusano J, et al. Functional interactions between somatodendritic dopamine release, glutamate receptors and brain-derived neurotrophic factor expression in mesencephalic structures of the brain. *Brain Res* 2004; 47: 126-44.
15. Landgraf R, Neumann ID. Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25: 150-76.
16. Stengel A, Goebel M, Yakubov I, et al. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology* 2009; 150: 232-8.
17. Gonzalez R, Tiwari A, Unniappan S. Pancreatic beta cells colocalized insulin and pronesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381: 643-8.
18. Foo KS, Brauner H, Ostenson CG, Broberger C. Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: distribution and relationship to glycaemic state. *J Endocrinol* 2010; 204: 255-63.
19. Pan W, Hsueh H, Kastin AJ. Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides* 2007; 28: 2223-8.
20. Price TO, Samson WK, Niehoff ML, Banks WA. Permeability of the blood-brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides* 2007; 28: 2372-81.
21. Stengel A, Goebel M, Wang L, et al. Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. *Endocrinology* 2009; 150: 4911-9.
22. Yosten GL, Samson WK. Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297: R330-6.
23. Price CJ, Samson WK, Ferguson AV. Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain Res* 2008; 1230: 99-106.
24. Shimizu H, Arima H, Ozawa Y, et al. Glucocorticoids increase NPY gene expression in the arcuate nucleus by inhibiting mTOR signaling in rat hypothalamic organotypic cultures. *Peptides* 2010; 31: 145-9.
25. Zorrilla EP, Taché Y, Koob GF. Nibbling at CRF receptor control of feeding and gastrocolonic motility. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 421-7.
26. Fekete EM, Inoue K, Zhao Y, et al. Delayed satiety-like actions and altered feeding microstructure by a selective type 2 corticotropin-releasing factor agonist in rats: intra-hypothalamic urocortin 3 administration reduces food intake by prolonging the post-meal interval. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32: 1052-68.
27. Stengel A, Goebel M, Wang L, Taché Y. Abdominal surgery activates nesfatin-1 immunoreactive brain nuclei in rats. *Peptides* 2010; 31: 263-70.
28. Bonnet MS, Pecchi E, Trouslard J, et al. Central nesfatin-1-expressing neurons are sensitive to peripheral inflammatory stimulus. *J Neuroinflammation* 2009; 6: 27.
29. Goebel M, Stengel A, Wang L, Taché Y. Restraint stress activates nesfatin-1-immunoreactive brain nuclei in rats. *Brain Res* 2009; 1300: 114-24.
30. Merali Z, Cayer C, Kent P, Anisman H. Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology* 2008; 201: 115-23.
31. Davis M. The role of the amygdale in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* 1992; 15: 353-75.
32. Xu L, Bloem B, Gaszner B, et al. Sex-specific effects of fasting on urocortin 1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 expression in the rat Edinger-Westphal nucleus. *Neuroscience* 2009; 162: 1141-9.
33. Nonogaki K, Ohba Y, Sumii M, Oka Y. Serotonin systems upregulate the expression of hypothalamic NUCB2 via 5-HT2C receptors and induce anorexia via a leptin-independent pathway in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372: 186-90.
34. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, et al. Expression of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in adaptive cytoprotection induced by mild stress. *J Physiol* 2000; 94: 83-1.
35. Konturek SJ, Brzozowski T, Konturek PK, et al. Role of salivary glands and epidermal growth factor (EGF) in gastrin secretion and mucosal integrity in rats exposed to stress. *Regul Pept* 1991; 32: 203-15.
36. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, et al. Classic NSAIDs and selective cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibitors in healing of chronic gastric ulcers. *Microsc Res Tech* 2001; 53: 343-53.
37. Ehrlich EW, Dallob A, De Lepeleire I, et al. Characterization of rofecoxib as a cyclooxygenase-2 isoform inhibitor and demonstration of analgesia in the dental pain model. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65: 336-47.

38. Lesch CA, Gilbertsen RB, Song Y, et al. Effect of novel anti-inflammatory compounds on healing of acetic acid-induced gastric ulcer in rats. *J Pharm Exp Ther* 1998; 287: 301-6.
39. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-42.
40. Whittle BJR, Lopez-Belmonte J, Moncada S. Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interaction with prostanoids and sensory neuropeptides. *Br J Pharmacol* 1990; 99: 607-11.
41. Konturek SJ, Brzozowski T, Pytko-Polonczyk J, Drozdowicz D. Comparison of cholecystokinin, pentagastrin and duodenal oleate in gastroprotection in rats. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 620-30.
42. Gonzales R, Kerbel B, Chun A, Unniappan S. Molecular, cellular and physiological evidences for the anorexigenic actions of nesfatin-1 in goldfish. *PLoS One* 2010; 5: 15201.
43. Tan BK, Hallschmid M, Kern W, et al. Decreased cerebrospinal fluid/plasma ratio of the novel satiety molecule, nesfatin-1/NUCB-2, in obese humans: evidence of nesfatin-1/NUCB-2 resistance and implications for obesity treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 669-73.
44. Goebel M, Stengel A, Wang L, Tache Y. Central nesfatin-1 reduces the nocturnal food intake in mice by reducing meal size and increasing inter-meals intervals. *Peptides* 2011; 32: 36-43.
45. Tabarin A, Diz-Chavesw Y, Consoli D, et al. Role of the corticotropin-releasing factor receptor type 2 in the control of food intake in mice: a meal pattern analysis. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 2303-14.
46. Goebel-Stengel M, Stengel A, Wang L, Tache Y. Localization of nesfatin-1 neurons in the mouse brain and functional implication. *Brain Res* 2011; 1396: 20-34.
47. Atsuchi K, Asakawa A, Ushikai M, et al. Centrally administered nesfatin-1 inhibits feeding behavior and gastroduodenal motility in mice. *Neuroreport* 2010; 21: 1008-11.
48. Gonazales R, Reingold BK, Gao X, et al. Nesfatin-1 exerts a direct, glucose-dependent insulinotropic action on mouse islet beta-and MIN6 cells. *J Endocrinol* 2011; 208: 9-16.
49. Nakata M, Manaka K, Yamamoto S, et al. Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca²⁺ influx through L-type channels in mouse islet beta-cells. *Endocr J* 2011; 58: 305-13.
50. Su Y, Zhang J, Tang Y, et al. The novel function of nesfatin-1: anti-hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 1039-42.
51. Yoshida N, Maejima Y, Sedbazar U, et al. Stressor-responsive central nesfatin-1 activates corticotrophin-releasing hormone, noradrenalin and serotonin neurons and evokes hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Aging* 2010; 2: 775-84.
52. Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 525-57.
53. Shimizu T, Lu L, Yokotani K. Possible inhibitory roles of endogenous 2-arachidonoylglycerol during corticotropin-releasing factor-induced activation of central symphato-adrenomedullary outflow in anesthetized rats. *Eur J Pharmacol* 2010; 641: 54-60.
54. Tanida M, Mori M. Nesfatin-1 stimulates renal sympathetic nerve activity in rats. *Neuroreport* 2011; 22: 309-12.
55. Yosten GL, Samson WK. The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298: 1642-7.
56. Stengel A, Tache Y. Neuroendocrine control of the gut during stress: corticotrophin-releasing factor signaling pathways in the spotlight. *Annu Rev Physiol* 2009; 71: 219-39.
57. Szlachcic A, Brzozowski T, Majka J, et al. Involvement of orexigenic peptides in the mechanism of gastric mucosal integrity and healing of chronic gastric ulcers. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 1214-23.