

ARTYKUŁ ORYGINALNY / ORIGINAL PAPER

## Ochronny wpływ greliny w przebiegu ostrego eksperymentalnego zapalenia trzustki

### Protective effect of ghrelin in experimental acute pancreatitis

Joanna Bonior<sup>1</sup>, Jolanta Jaworek<sup>1</sup>, Anna Leja-Szpak<sup>1</sup>, Michalina Kot<sup>1</sup>,  
Magdalena Macko<sup>1</sup>, Romana Tomaszewska<sup>3</sup>, Jerzy Stachura<sup>3</sup>,  
Stanisław J. Konturek<sup>2</sup>, Wiesław W. Pawlik<sup>2</sup>

#### Streszczenie

Grelina, peptyd pierwotnie wyizolowany z żołądka, został również zidentyfikowany w mózgu. Grelina wykazuje działanie ochronne w stosunku do śluzówki żołądka w przebiegu jej ostrego uszkodzenia ponadto pobudza uwalnianie hormonu wzrostu (GH) oraz wpływa na czynność zewnątrz i wewnątrzwydzielniczą trzustki. Wykazano wprawdzie obecność receptorów grelinowych w trzustce ale rola greliny w ochronie trzustki nie została do tej pory poznana. **Cel pracy:** Określenie wpływu obwodowego, podania greliny na przebieg ceruleinowego zapalenia trzustki (CIP) przy udziale nerwów czuciowych (sensory nerves SN). **Metody:** Badania zostały przeprowadzone na szczurach rasy Wistar z zachowanymi SN oraz u zwierząt, których nerwy czuciowe zostały deaktywowane poprzez podanie kapsaicyny (capsaicin deactivation CD) w dawce całkowitej 100 mg/kg, na 10 dni przed zasadniczym eksperymentem. CIP wywołano przez podskórną (s.c.) infuzję ceruleiny (25 µg/kg). Grelina została podana zwierzętom dootrzewnowo (i.p.) w dawkach 10, 20, 40 lub 50 µg/kg na 30 minut przed rozpoczęciem CIP. Osoczowy poziom greliny został zmierzony przy użyciu metody radioimmunoeseju (RIA). **Wyniki:** CIP zostało potwierdzone w obrazie histopatologicznym oraz wzrostem osoczowej aktywności lipazy u wszystkich zwierząt. Podanie greliny obwodowo (i.p.), w dawkach wzrastających zwiększyło osoczowy poziom greliny w sposób zależny od zastosowanej dawki hormonu. U szczurów, które otrzymały grelinę w dawce: 20, 40 lub 50 µg/kg przed rozpoczęciem ostrego zapalenia trzustki nasilenie zmian zapalnych gruczołu uległo znamiennej zmniejszeniu. Kapsaicynowa deaktywacja SN całkowicie odwróciła ochronne działanie greliny w ostrym zapaleniu trzustki. **Wniosek:** Grelina zapobiega rozwojowi ostrego zapalenia trzustki poprzez aktywację mechanizmów centralnych. (*Clin. Exp. Med. Lett.* 2005; 46(3):39-46)

**Słowa kluczowe:** grelina, ostre zapalenie trzustki, osoczowa aktywność greliny.

#### Summary

**Background:** Ghrelin, a peptide originally isolated from the stomach, has been also identified in the brain. Ghrelin protects the gastric mucosa from acute damage, stimulates growth hormone (GH) release and affects pancreatic exocrine and endocrine secretions. Ghrelin receptors has been detected in the pancreas but the role of ghrelin in the pancreatic protection is unclear. **Aim of the study:** To determine the effects of peripheral application of ghrelin on the course of caerulein-induced pancreatitis (CIP) and to investigate the involvement of sensory nerves (SN) in above effects. **Methods:** The study was carried out on the Wistar rats with intact SN or capsaicin-deactivated SN. To deactivate SN capsaicin was given to one group of rats at total dose of 100 mg/kg 10 days before the tests. CIP was induced by subcutaneous (s.c.) caerulein infusion (25 µg/kg) to the conscious rats. Ghrelin was given to the rats intraperitoneally (i.p.) at doses of 10, 20, 40 or 50 µg/kg 30 min prior to the start of CIP. Plasma level of ghrelin was measured by radioimmunoesej (RIA). **Results:** CIP was confirmed by histological assessment and characterized by usual edema and rise of plasma lipase activity. Peripheral application of increasing concentration of ghrelin (i. p.) resulted in the dose-dependent rise of plasma level of ghrelin. Ghrelin given i.p. at doses of 20, 40 or 50 µg/kg, 30 min prior to the start of CIP prevented from the acute pancreatitis. These effects were reversed in the rats with capsaicin-deactivated SN. **Conclusions:** Ghrelin prevents from the development of acute pancreatitis though activation of central mechanisms. (*Clin. Exp. Med. Lett.* 2005; 46(3):39-46)

**Key words:** ghrelin, acute pancreatitis, plasma ghrelin activity.

Przysłane 24.08.2005; poprawione 16.09.2005; zaakceptowane 27.09.2005

Zakład Fizjologii Medycznej Wydziału Ochrony Zdrowia<sup>1</sup>, Katedra Fizjologii<sup>2</sup> i Zakład Patomorfologii<sup>3</sup> Wydziału Lekarskiego, Collegium Medium, Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, Polska.

Department of Medical Physiology Health Care Faculty, Jagiellonian University Medical College in Cracow, Poland

Adres do korespondencji:

Dr Joanna Bonior, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Zakład Fizjologii Medycznej, 31-531 Kraków, ul. Grzegorzewska 16, tel.: 424-72-31, 424-72-30, e-mail: jbonior@gazeta.pl

## Wstęp

Grelina, nowy 28 aminokwasowy polipeptyd, po raz pierwszy została opisana przez Bowera w 1997 roku, jako peptyd uwalniający hormon wzrostu (GHRPs – growth hormone releasing peptide). Należy ona do niewielkiej grupy encefalinopodobnych molekuł, będących endogennym ligandem dla GH (1, 2). W dwa lata później grelina została wyizolowana z żołądka, gdzie produkowana jest przez komórki enteroendokryne X/A, obecnie nazywane komórkami grelinowymi (1, 2). Substancja ta wykazuje strukturalne podobieństwo do motyliny, podobne są też ich receptory (3). Na chromosomie ludzkim 3p26-p25 zlokalizowano gen kodujący grelinę (4).

Obok żołądka, głównym miejscem produkcji greliny w organizmie jest trzustka, a dokładnie komórki epsilon zlokalizowane w obrębie wysp trzustkowych (5). Obecność tej substancji wykazano również w przysadce mózgowej i w podwzgórzu oraz w łożysku, nerkach, jelitach, wątrobie oraz komórkach układu odpornościowego (5, 6). Grelina działa przez specyficzne receptory, występujące jako dwa podtypy: GHS-R 1a i 1b. Obecność receptorów grelinowych wykazano w centralnym systemie nerwowym (podwzgórze, przysadka) oraz w licznych narządach obwodowych (przewód pokarmowy, układ sercowo-naczyniowy, adipocyty) (7).

Grelina wykazuje wielokierunkowe działanie biologiczne. W obrębie centralnego systemu nerwowego oprócz tego, że pobudza uwalnianie GH, reguluje również gospodarkę energetyczną (1). Pobudza apetyt, stymulując NPY, poprzez regulację uwalniania AgRP (agouti-related peptide) w podwzgórzu, odpowiedzialnego za produkcję i wydzielanie NPY. Grelina jest uważana za naturalnego antagonistę leptyny (8, 9).

W przewodzie pokarmowym grelina pobudza motorykę i wydzielanie kwasu żołądkowego u szczurów i bierze udział w krótkoterminowej regulacji równowagi energetycznej (10). Badania wykazały, że wagotomia bądź podanie atropiny znosi pobudzający wpływ greliny na wydzielanie kwasu żołądkowego (11). Istnieją również doniesienia, że centralne podanie tego peptydu u szczurów nie będących w stanie narkozy, powoduje zahamowanie wydzielania kwasu żołądkowego (12).

Badania wykazały również, że grelina hamuje wydzielanie trzustkowe pobudzane cholecystokininą (CCK) zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. Możliwe, że hamujący wpływ greliny na czynność zewnątrzwydzielniczą trzustki jest wynikiem pobudzenia przez tę substancję trzustkowych nerwów autonomicznych (13). Peptyd ten wpływa również na czynność endokrynną gruczołu, regulując uwalnianie insuliny i metabolizm glukozy, jednak dane dotyczące wpływu greliny na gospodarkę węglowodanową nie są jednoznaczne. Wyniki badań wskazują, że grelina z jednej strony pobudza uwalnianie insuliny z wysp trzustkowych w warunkach *in vivo* i *in vitro* (14-16). Z drugiej jednak strony uwalnianie insuliny z izolowanej trzustki szczurzej pobudzanej glukozą, argininą i karbaminocholiną jest hamowane przez grelinę (17). Obserwacje te mogą sugerować,

że grelina wywiera toniczne działanie hamujące, na uwalnianie insuliny z komórek  $\beta$ . Hamowanie przez grelinę uwalniania insuliny jest potwierdzane przez część badaczy (18, 19), podczas gdy inni autorzy kwestionują taką zależność (20).

Dotychczas nie przeprowadzono kompleksowych badań dotyczących fizjologicznej roli greliny w trzustce oraz jej wpływu na ostre zapalenie trzustki (OZT). Stwierdzono wprawdzie, że peptyd ten wywiera ochronne działanie w przebiegu OZT, modulując odpowiedź układu immunologicznego (21), jednak mechanizm tego działania nie został w pełni wyjaśniony.

Cel pracy: Określenie wpływu obwodowego, podania greliny na przebieg ceruleinowego zapalenia trzustki (CIP) przy udziale nerwów czuciowych (SN).

## Materiał i metodyka

Badania przeprowadzono na szczurach białych płci męskiej, rasy Wistar, o masie ciała 170-200 g, karmionych standartowym granulatem z zachowaniem swobodnego dostępu do wody. Szczury przebywały w klatkach, znajdujących się w pomieszczeniu o temperaturze pokojowej, dobrze oświetlonym i wietrzonym, z zachowaniem prawidłowego rytmu dobowego dzień/noc. Na 24 godzin przed badaniem zwierzęta pozbawiano pokarmu, dostęp do wody nie był ograniczany. Liczebność grup doświadczalnych wynosiła 10-15 szczurów.

Protokół badań został zaaprobowany przez Komisję Etyczną Badań Doświadczalnych Uniwersytetu Jagiellońskiego.

### Protokół eksperymentalny:

#### Część A.

#### **Badanie wpływu greliny podawanej dootrzewnowo na przebieg OZT u szczurów z zachowanymi nerwami czuciowymi (SN).**

W trakcie przeprowadzania badań zwierzęta zostały umieszczone w indywidualnych klatkach typu Bollman. Ostre zapalenie trzustki wywoływano poprzez podskórne (s.c.) podawanie wysokich stężeń ceruleiny (Takus - Pharmacia GmbH, Erlangen, Germany) w dawce 5  $\mu$ g/kg-godzinę przez okres 5 godzin. Ceruleinę rozpuszczono w roztworze soli fizjologicznej, bezpośrednio przed rozpoczęciem doświadczenia. Zwierzęta stanowiące grupę kontrolną otrzymywały podskórnie zamiast roztworu ceruleiny, sól fizjologiczną.

Grelina (Bachem AG, Budendorf, Switzerland) w stężeniach wzrastających (10; 20; 40 i 50  $\mu$ g/kg), rozpuszczona w 0,5 ml soli fizjologicznej podawana była w postaci bolusu dootrzewnowo (i.p.) zwierzętom na 30 minut przed rozpoczęciem podawania ceruleiny (dla wywołania OZT), lub soli fizjologicznej w grupie kontrolnej.

## Część B.

### **Badanie wpływu greliny podawanej dootrzewnowo na przebieg OZT u szczurów z deaktywacją nerwów czuciowych (SN).**

W tej serii badań zastosowano grelinę w standardowej dawce ochronnej 50 µg/kg i.p.

Deaktywację nerwów czuciowych wykonano poprzez podawanie kapsaicyny w dawce całkowitej 100 mg/kg, na 10 dni przed eksperymentem. W celu sprawdzenia CD przeprowadzono test rogówkowy u zwierząt. Schemat eksperymentu analogiczny jak w części A.

Badania przeprowadzono w następujących grupach doświadczalnych:

1. Kontrola.
2. Ostre zapalenie trzustki.
3. Ostre zapalenie trzustki + grelina.
4. 0,9 % NaCl + grelina.

### **Masa trzustki i ocena histopatologiczna**

Po uśmierceniu zwierząt, trzustkę wyizolowano z jamy brzusznej. Następnie oczyszczono z tkanki tłuszczowej, wypłukano w soli fizjologicznej, odsączone na bibule i zważono. Obraz histologiczny zmienionej zapalnie tkanki został oceniany przy współpracy z doświadczonym histologiem w Katedrze Patomorfologii CM UJ. Ocenę preparatu, utrwalonego w 10% formalinie, a następnie barwionego hematoksyliną i eozyną, dokonano przy użyciu mikroskopu optycznego typu Axiophot (Jena, Germany). Oceniając preparat w skali od 0 do 3 wzięto pod uwagę następujące jej parametry: obrzęk, nacieczenie leukocytarne oraz stopień wakuolizacji.

### **Oznaczenie aktywności lipazy oraz poziomu greliny w surowicy krwi.**

Natychmiast po otwarciu jamy brzusznej, uwidaczniano żyłę główną dolną i pobierano krew w celu oznaczenia osoczowej aktywności lipazy oraz osoczowego stężenia greliny.

Osoczowa aktywność lipazy oznaczano przy użyciu analizatora Kodak Ectachem DT II System (Eastman Kodak Kompany, Rochester, NY, USA), używając Lipa DT Slides (Vitros DT Chemistry System, Johnson & Johnson Clinical Diagnostic, Inc., Rochester, NY, USA). Wartości osoczowej aktywności lipazy wyrażono w IU/L.

Stężenie greliny w osoczu mierzono przy użyciu radioimmunoassay dla greliny szczurzej (RIA) stosując kit PENINSULA LABORATORIES, INC. DIVISION OF BACHEM305 Old Country Road, San Carlos, CA 94070. Stężenie wyrażono w pg/ml.

### **Statystyczne opracowanie wyników badań**

Wyniki badań przeanalizowano w oparciu o analizę wariancji lub rangowy test znaków Wilcozona. Wyniki podano jako średnie wartości odchylenia standardowego (±SEM), przyjmując za statystycznie istotne te, które różniły się poziomem istotności  $p < 0.05$ .

## Wyniki badań

### **Wpływ greliny podawanej dootrzewnowo na przebieg OZT u szczurów z zachowanymi nerwami czuciowymi oraz z ich deaktywacją.**

Ostre zapalenie trzustki, wywołane podskórną infuzją ceruleiny w dawce 5 µg/kg/godzinę przez okres 5 godzin, spowodowało rozwój zmian zapalnych u wszystkich zwierząt.

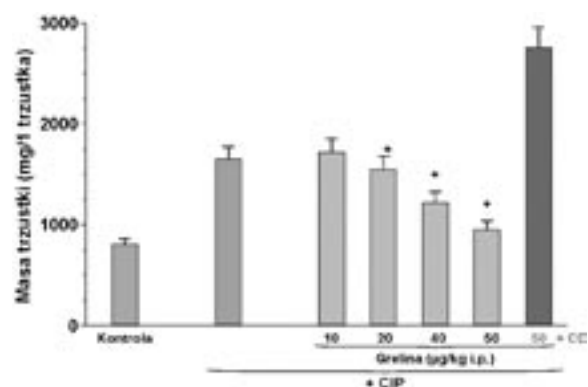
### **Masa trzustki i ocena histopatologiczna**

Masa trzustki w grupie kontrolnej zwierząt, otrzymujących zamiast ceruleiny sól fizjologiczną, wynosi około  $800 \pm 65$  mg. Ostre zapalenie trzustki (OZT), wywołane pięciogodziną infuzją ceruleiny (5 µg/kg – godzinę), zwiększyło ponad dwukrotnie masę trzustki ( $1780 \pm 150$  mg) w porównaniu z grupą kontrolną (ryc.1).

Ceruleinowe zapalenie trzustki (CIP) wywołało zmiany w obrazie histopatologicznym. Doprowadziło do powstania obrzęku między- oraz wewnątrzrzazikowego, nacieku z komórek zapalnych i wakuolizacji komórek pęcherzykowych w tkance trzustkowej (tabela 1, ryc. 2). Zmian tych nie stwierdzono w grupie kontrolnej zwierząt, otrzymującej sól fizjologiczną (tabela 1)

Podanie szczurom z zachowanymi SN greliny (i.p.) w dawkach wzrastających na 30 minut przed rozpoczęciem infuzji ceruleiny (dla wywołania OZT), zmniejszyło w sposób znamieny statystycznie masę trzustki przy stężeniach hormonu 20, 40 i 50 µg/kg i. p. (ryc. 1). Ochronne efekty greliny zostały potwierdzone poprzez badanie histopatologiczne, w którym zaobserwowano zmniejszenie nasilenia zmian zapalnych przy wyżej zastosowanych dawkach peptydu (ryc 2. tab. 1).

U szczurów u których przeprowadzono deaktywację nerwów czuciowych przy użyciu kapsaicyny nie stwierdzono korzystnego działania greliny na trzustkę w przebiegu OZT (ryc. 1 i 2, tab. 1)



Ryc.1. Wpływ wzrastających dawek greliny (10, 20, 40 lub 50 µg/kg i.p.) na masę trzustki u zwierząt z ostrym ceruleinowym zapaleniem trzustki przy zachowanych SN oraz z ich CD. Krzyżyk (+) oznacza znamienne statystycznie różnicę w odniesieniu do wartości uzyskanych w grupie zwierząt otrzymujących grelinę z ceruleinowym zapaleniem trzustki i z zachowanymi SN w porównaniu do szczurów poddanych CD przy  $p < 0.05$ . Średnia ± SEM z wartości otrzymanych od 10-15 szczurów w grupie doświadczalnej.

### Oznaczenie aktywności lipazy surowicy krwi.

Aktywność lipazy w grupie kontrolnej zwierząt otrzymujących sól fizjologiczną, wynosi około  $100 \pm 15$  IU/L. Ceruleinowe zapalenie trzustki spowodowało osiemdziesięciokrotny wzrost aktywności tego wskaźnika ( $8000 \pm 900$  IU/L) w osoczu krwi w porównaniu do grupy kontrolnej zwierząt (ryc. 3).

Podanie greliny w dawkach 20, 40 i 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i. p. na 30 minut przed rozpoczęciem infuzji ceruleiny, zwierzętom z zachowanymi SN, zredukowało aktywność lipazy w osoczu krwi (ryc. 3)

Obniżenia poziomu lipazy w osoczu po podaniu greliny nie stwierdzono w przebiegu ostrego zapalenia trzustki w grupie szczurów poddanych deaktywacji nerwów czuciowych (ryc. 3)

### Oznaczenie aktywności greliny w surowicy krwi.

Poziom endogennej greliny, mierzony w osoczu krwi zwierząt głodzonych przez 24 godzin, wynosi  $30.0 \pm 4.0$  pg/ml. Ceruleinowe zapalenie trzustki powoduje nieznaczny spadek osoczowej aktywności greliny (ryc. 4).

Podanie wzrastających stężeń greliny: 20, 40 i 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i. p. na 30 minut przed rozpoczęciem infuzji ceruleiny, wywołało znamienne statystycznie i zależny od dawki greliny wzrost poziomu tego peptydu w osoczu krwi (ryc. 4).

Odnerwienie czuciowe nie zmniejszyło osoczowej aktywności greliny w przebiegu OZT (ryc. 4).

### Dyskusja

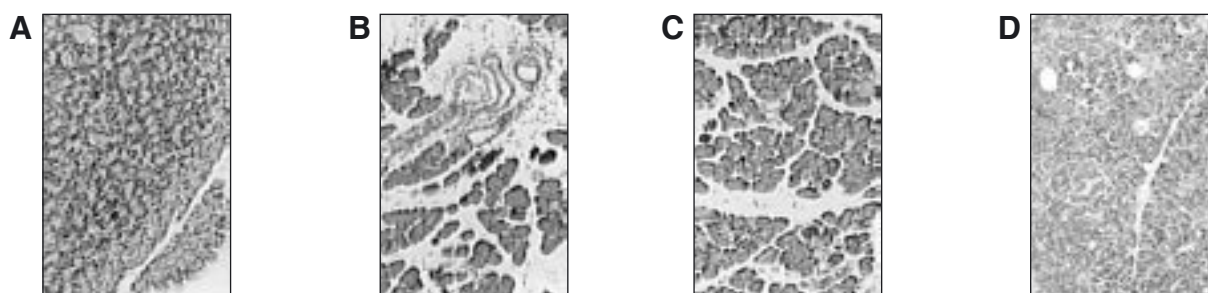
Przeprowadzone badania wykazały, że grelina podana obwodowo, chroni gruczoł trzustkowy przed uszkodzeniem w przebiegu OZT, a w mechanizmie protekcyjnego działania greliny biorą udział nerwy czuciowe.

Pierwotne nerwy czuciowe stanowią populację niezmielinizowanych, cienkich włókien wyposażonych w żyłakowatości uwalniające one na swych zakończeniach neuromediatory (CGRP) i neuromodulatory (SP, somatostatyna, VIP, GRP, dynorfina) (22, 23). Nerwy czuciowe są przede wszystkim odpowiedzialne za przewodzenie nocyceptywnych informacji do centralnego systemu nerwowego. Poza funkcją sensoryczną, biorą udział w lokalnej odpowiedzi odruchowej (24, 25).

Nerwy czuciowe są szczególnie wrażliwe na kapsaicynę, ostry wyciąg z czerwonej papryki, która jest w stosunku do nich selektywną neurotoksyną (25). Drażnienie zakończeń nerwów czuciowych przy użyciu niewielkich dawek kapsaicyny powoduje stymulację i uwalnianie neuropeptydów, w tym CGRP (25-27). Natomiast podawanie tej neurotoksyny w wysokich dawkach pro-

Tabela 1. Zmiany histologiczne tkanki trzustkowej wywołane podskórną infuzją ceruleiny (5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{godzinę} \times 5$  godzin s.c.) lub podskórną infuzją ceruleiny poprzedzoną dootrzewnowym podaniem wzrastających stężeń greliny (10, 20, 40 lub 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.p.) z zachowanymi SN i ich CD. Każda grupa doświadczalna liczyła 10-15 szczurów. Gwiazdka (\*) oznacza znamienne statystycznie różnicę w odniesieniu do wartości uzyskanych w grupie zwierząt otrzymujących grelinę z ceruleinowym zapaleniem trzustki i z zachowanymi SN w porównaniu do szczurów poddanych CD przy  $p < 0.05$ . Średnia  $\pm$  SEM z wartości otrzymanych od 10-15 szczurów w grupie doświadczalnej.

	Obrzęk 0-3	Nacieki zapalne 0-3	Wakuolizacja komórek 0-3
Kontrola	$0.1 \pm 0.1$	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$
Ceruleinowa zapalenie trzustki	$2.5 \pm 0.3$	$2.3 \pm 0.4$	$3.0 \pm 0.0$
Ceruleinowa zapalenie trzustki + grelina 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (i.p.)	$2.0 \pm 0.5$	$1.9 \pm 0.5$	$2.5 \pm 0.3$
Ceruleinowa zapalenie trzustki + grelina 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (i.p.)	$2.0 \pm 0.0^*$	$1.5 \pm 0.4^*$	$2.6 \pm 0.4^*$
Ceruleinowa zapalenie trzustki + grelina 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (i.p.)	$2.0 \pm 0.0^*$	$1.25 \pm 0.2^*$	$2.5 \pm 0.3^*$
Ceruleinowa zapalenie trzustki + grelina 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (i.p.)	$1.5 \pm 0.4^*$	$1.33 \pm 0.2^*$	$2.0 \pm 0.0^*$
Ceruleinowa zapalenie trzustki + grelina 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (i.p.) + CD SN	$2.3 \pm 0.3$	$2.0 \pm 0.0$	$2.7 \pm 0.3$



Ryc.2. Mikroskopowy obraz tkanki trzustkowej szczura: A – kontrola, B – OZT, C - OZT+ grelina (i.p.), D - OZT+ grelina (i.p.) + SN CD

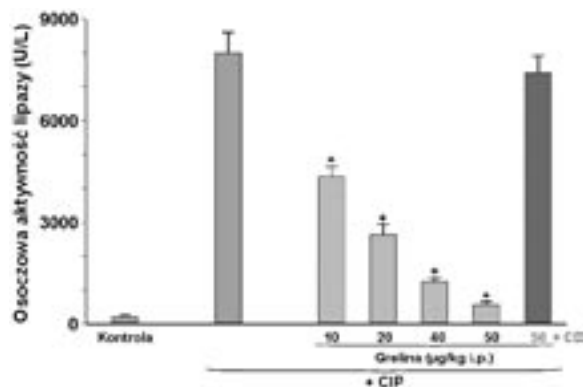
wadzi do otwierania kanałów wapniowych w obrębie nerwów czuciowych i długotrwałego, funkcjonalnego ich uszkodzenia. Ich deaktywacja prowadzi do spadku zawartości CGRP w osoczu i w tkankach, w tym również w trzustce (25, 27).

Podawanie wysokich dawek ceruleiny doprowadziło do pojawienia się zmian zapalnych w postaci ostrego ceruleinowego zapalenia trzustki (CIP). W obrazie histopatologicznym obserwowano obrzęk między- oraz wewnątrzrzazikowy, naciek z komórek zapalnych i wakuolizację komórek pęcherzykowych. Ponadto doszło do silnego wzrostu osoczowej aktywności lipazy oraz niewielkiego spadku osoczowej aktywności greliny.

Obwodowe podanie wzrastających dawek greliny (10, 20, 40 lub 50 µg/kg i.p.), przed wywołaniem OZT zmniejszyło w sposób zależny od dawki odpowiedź zapalną gruczołu u zwierząt z zachowanymi nerwami czuciowymi. Ochronny efekt greliny manifestował się spadkiem masy gruczołu, potwierdzonym w obrazie histopatologicznym oraz zmniejszeniem osoczowej aktywności lipazy i wzrostem osoczowej aktywności greliny.

Istnieją również badania eksperymentalne, które wykazały, że grelina wywiera ochronny wpływ na trzustkę w przebiegu CIP poprzez modulację odpowiedzi immunologicznej (21). Podanie greliny spowodowało zahamowanie nacieczenia leukocyтарnego w obrębie tkanki trzustkowej oraz zmniejszenie uwalniania pozapalnej IL-1β i ograniczenie CIP (21). Wykazano również, że grelina spowodowała redukcję syntezy DNA w przebiegu OZT, co wskazuje, że peptyd ten inicjuje i poprawia zdolność trzustki do regeneracji (21).

Modulacja odpowiedzi immunologicznej przy udziale greliny, może wynikać z jej wpływu na komórki zapalne. Badania wykazały ekspresję tego peptydu oraz

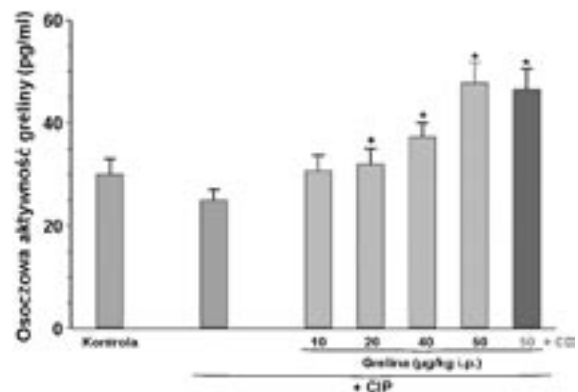


Ryc.3. Zmiany osoczowej aktywności lipazy u szczurów z ceruleinowym zapaleniem trzustki po podaniu wzrastających dawek greliny (10, 20, 40 lub 50 µg/kg i.p.) u zwierząt z zachowanymi SN oraz z ich CD. Krzyżyk (\*) oznacza znamiennej statystycznie różnicę w odniesieniu do wartości uzyskanych w grupie zwierząt otrzymujących grelinę z ceruleinowym zapaleniem trzustki i z zachowanymi SN w porównaniu do szczurów poddanych CD przy  $p < 0.05$ . Średnia  $\pm$  SEM z wartości otrzymanych od 10-15 szczurów w grupie doświadczalnej.

jego receptora na ludzkich limfocytach typu T oraz monocytach (28). Grelina działając na receptory GHS-R w obrębie komórek zapalnych, hamuje ekspresję pozapalnych cytokin takich jak: IL-1β, IL-6 oraz TNF-α. Grelina hamuje również ekspresję cytokin indukowaną przy udziale leptyny, podczas gdy ta ostatnia zwiększa ekspresję GHS-R w obrębie ludzkich limfocytów T (28). Poza tym grelina wywiera potężny efekt przeciwzapalny zmniejszając anoreksję wywołaną endotoksemią w modelu zwierzęcym. Stąd uważa się, że grelina może pełnić rolę klucza sygnałowego, jako łącznik pomiędzy osią metaboliczną i systemem immunologicznym, będąc obok GHS-R, agonistą chorób przebiegających z kacheksją (28).

Istnieją również dane, że grelina wywołuje działanie gastroprotekcjne w przebiegu wrzodów etanolowych z uprzednim zastosowaniem, bądź bez indometacyny (29). Egzogenna grelina zmniejsza powstawanie ostrych wrzodów żołądka, z jednoczesną poprawą żołądkowego przepływu krwi i spadkiem ekspresji genowej TNF-α, nie zmieniając sygnału dla TGF-α (29). Zastosowanie indometacyny, która zmniejsza generację PGE<sub>2</sub>, powoduje zwiększenie uszkodzeń żołądka i eliminuje gastroprotekcjny wpływ greliny. Stąd można wnioskować efekty greliny w żołądku zachodzą przy udziale prostaglandyn (29).

Przeprowadzone badania wykazały, że kapsaicynowa deaktywacja nerwów czuciowych (CD SN) odwróciła korzystne działanie greliny na trzustkę w przebiegu OZT, nie wpłynęła jednak na osoczową aktywność greliny, która utrzymywała się nadal na wysokim poziomie.



Ryc.4. Zmiany osoczowej aktywności greliny u szczurów z ceruleinowym zapaleniem trzustki po podaniu wzrastających dawek greliny (10, 20, 40 lub 50 µg/kg i.p.) u zwierząt z zachowanymi SN oraz z ich CD. Krzyżyk (\*) oznacza znamiennej statystycznie różnicę w odniesieniu do wartości uzyskanych w grupie zwierząt otrzymujących grelinę z ceruleinowym zapaleniem trzustki i z zachowanymi SN w porównaniu do szczurów poddanych CD przy  $p < 0.05$ . Gwiazdka (\*) oznacza znamiennej statystycznie różnicę w odniesieniu do wartości uzyskanych w grupie kontrolnej zwierząt otrzymujących ceruleinę bez greliny u szczurów z zachowanymi SN  $p < 0.05$ . Średnia  $\pm$  SEM z wartości otrzymanych od 10-15 szczurów w grupie doświadczalnej.

Udział nerwów czuciowych w ochronie trzustki przed uszkodzeniem przez ostry proces zapalny był już uprzednio badany. Istnieją doniesienia, że CD SN całkowicie odwróciła ochronny wpływ leptyny w przebiegu ceruleinowego zapalenia trzustki w modelu zwierzęcym (30). Odmiennie wyniki doświadczeń opublikowano badając udział nerwów czuciowych w ochronnym działaniu melatoniny na trzustkę w przebiegu jej zapalenia. Wykazano bowiem, że CD SN nie znosi antyoksydacyjnego lokalnego efektu stosowanej indoli (30). Natomiast zastosowanie antagonisty CGRP – CGRP<sub>8-37</sub> częściowo odwraca ochronny efekt leptyny na trzustkę w przebiegu OZT, nie znosząc pankreatoprotekcyjnego wpływu melatoniny (30). Istnieją również doniesienia, że stymulacja nerwów czuciowych przy użyciu niskich dawek kapsaicyny chroni trzustkę przed uszkodzeniem w przebiegu jej ostrego zapalenia w modelu ischemii/reperfuzji (I/R) w wyniku zwiększonego uwalniania CGRP (25-27, 31), co z kolei prowadzi do redukcji nacieczenia leukocytarnego i produkcji IL-1 $\beta$ , zmniejszając zmiany morfotyczne (31). Korzystny wpływ stymulacji SN wiąże się również z poprawą trzustkowego przepływu krwi w modelu I/R i prawdopodobną inaktywacją enzymów trzustkowych oraz mediatorów zapalnych. CD SN znosi ten korzystny wpływ CGRP na trzustkę w modelu I/R. Natomiast podanie CGRP przed I/R odwraca niekorzystny wpływ CD SN na trzustkę (31).

Podobnie efekty gastroprotecyjne ze strony greliny, zostały zniesione przy zastosowaniu CD SN oraz wagotomii (32). Badania wykazały, że grelina pobudza wydzielanie żołądkowe i zmniejsza uszkodzenie żołądka wywołane etanolem lub imersją wodną (WRS) poprzez poprawę żołądkowego przepływu krwi (GBF) oraz stężenia NO. Gastroprotektoryny wpływ greliny został zniesiony po przeprowadzeniu wagotomii, która zmniejszyła zahamowanie COX i uwalnianie PG. Natomiast CD SN lub zastosowanie CGPR<sub>8-37</sub> zniosło korzystny wpływ greliny w wyniku zablokowania układu NOS z L-NNA (32).

Badania nasze wykazały, że grelina podana obwodowo wywiera ochronny wpływ na trzustkę w przebiegu CIP przy udziale nerwów czuciowych, bowiem ich deaktywacja nie zmieniła jej osoczowej aktywności.

Grelina nie jest peptydem uwalnianym do światła przewodu pokarmowego ale jest uwalniana do układu krążenia (33). Osoczowy poziom greliny jest regulowany przez przyjmowanie pokarmu. Stężenie greliny we krwi wzrasta w trakcie głodzenia i spada po przyjęciu pokarmu (34, 35). Do tej pory nie wyjaśniono jakie czynniki biorą udział w regulacji uwalniania tego peptydu, ale uważa się, że zasadnicze znaczenie może odgrywać stężenie glukozy we krwi (36, 37). Badania wykazały, że doustne, bądź dożylnie podanie glukozy obniża osoczowe stężenie greliny (36). Z drugiej jednak strony rozciągnięcie żołądka przy użyciu czystej wody nie wpływa na poziom greliny. Osoczowe stężenie greliny spada po podaniu bogatofłuszczonego posiłku i wzrasta po spożyciu niskobiałkowego pokarmu (38). Wykazano również, że u osób otyłych osoczowe stężenie greliny jest niskie, w przeciwieństwie do osób szczupłych (39). Poziom greliny we krwi znacznie wzrasta w przebiegu

anoreksji i bulimi i wraca do normy po osiągnięciu normalnej wagi ciała (40, 41)

Dwie duże formy greliny zostały zidentyfikowane w żołądku i w osoczu (grelina n-octanoyl modified i des-acyl) (33). Stężenie greliny we krwi ludzkiej wynosi 10-20 fmol/ml (n-octanoyl) i 100-120 fmol/ml (całkowita koncentracja greliny acyl-modified i des-acyl). Koncentracja greliny w żołądku szczurzym wynosi 377,31  $\pm$  55,83 fmol/ml (n-octanoyl) i 1779,8  $\pm$  533,9 fmol/ml (całkowita koncentracja greliny acyl-modified i des-acyl) (42). Totalna gastrektomia powoduje spadek osoczowej koncentracji greliny do 35% (43), która to ilość produkowana jest przede wszystkim przez trzustkę i w niewielkiej ilości przez jelita (33). Zawartość greliny w centralnym systemie nerwowym jest bardzo mała (42).

Badania nasze wykazały, że osoczowa koncentracja greliny w grupie kontrolnej u szczurów głodzonych wynosi 30  $\pm$  4,0 pg/ml i spada do 25  $\pm$  2,0 pg/ml w przebiegu CIP.

Dotychczasowe badania wykazały, że dootrzewnowe podanie lipopolisacharydów (LPS) u zwierząt zmniejsza przyjmowanie pokarmu i osoczową koncentrację greliny o około 50% (44). W przebiegu sepsy wywołanej podawaniem LPS, dochodzi do wzrostu poziomu krążących czynników odpowiedzialnych za anoreksję, takich jak cytokiny, czy leptyna (45, 46)

Dootrzewnowe podanie greliny przed wywołaniem CIP u szczurów z zachowanymi SN, spowodowało zależny od dawki, proporcjonalny wzrost osoczowej koncentracji tego peptydu, najwyższy przy podaniu 50  $\mu$ g/kg. Zastosowanie CD SN nie zmieniło osoczowej koncentracji greliny, która utrzymywała się na poziomie 46,5 pg/ml. Do tej pory brak jednak doniesień dotyczących udziału nerwów czuciowych w regulacji osoczowej koncentracji greliny zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w OZT.

Nasze badania wykazały, że grelina podawana obwodowo zmniejsza uszkodzenie trzustki powstałe w przebiegu ostrego zapalenia tego gruczołu. Ten obwodowy efekt greliny zachodzi przy udziale nerwów czuciowych oraz wiąże się ze wzrostem osoczowego poziomu greliny. Kapsaicynowa deaktywacja nerwów czuciowych całkowicie odwraca korzystny, obwodowy wpływ greliny na trzustkę w przebiegu OZT.

## Piśmiennictwo

1. Kojima M, Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999; **402**:656-660.
2. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A 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**:4255-4261.
3. Asakawa A, Inui A, Kaga T, et al. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with struc-

- tural resemblance to motilin. *Gastroenterology*. 2001;120(2):337-45.
4. Wajnrach MP, Ten IS, Gertner JM, Leivel RL. Genomic organization of the human GHRELIN gene. *J Endoc Genet* 2000;1:231-3.
  5. Wang G, Lee HM, Englander E, Greeley GH Jr. Ghrelin-not just another stomach hormone. *Regul Pept*. 2002;105(2):75-81.
  6. Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, Inagaki C. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(9):4284-91.
  7. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, 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):2988.
  8. Nakazato M, Murakami N, Date Y, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. 2001;409(6817):194-8.
  9. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(12):5992.
  10. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, et al. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276(3):905-8.
  11. Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;280(3):904-7.
  12. Sibilia V, Pagani F, Guidobono F, et al. Evidence for a central inhibitory role of growth hormone secretagogues and ghrelin on gastric acid secretion in conscious rats. *Neuroendocrinology* 2002; 75:92-97
  13. Zhang W, Chen M, Chen X, Segura BJ, Mulholland MW. Inhibition of pancreatic protein secretion by ghrelin in the rat. *J Physiol* 2001;537:231-236
  14. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, et al. Ghrelin is present in pancreatic -cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 2002; 51:124-129
  15. Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley Jr GH. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 2002;143:185-190
  16. Adeghate E, Ponery AS. Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *J Neuroendocrinol* 2002;14:555-560
  17. Egido EM, Rodriguez-Gallardo J, Silvestre RA, Marco J. Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *Eur J Endocrinol* 2002;146:241-244
  18. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001;50:1714-1719
  19. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, 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;86:4753-4758
  20. Caixas A, Bashore C, Nash W, Pi-Sunyer F, Laferriere B. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1902
  21. Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, et al. Ghrelin attenuates the development of acute pancreatitis in rat. *Pharmacol J Physiol*. 2003;54(4):561-73.
  22. Sternini C, Cord JP. Ultrastructural characterization of calcitonin gene-related peptide-containing fibers and islet cells In the rat pancreas. *Pancreas* 1991;6:375-384.
  23. Karlsson S, Sundler F, Ahren B. Neonatal capsaicin-treatment in mice: effects on pancreatic peptidergic nerves and 2-deoxy-D-glucose-induced insulin and glucagon secretion. *J Auton Nerv Syst*. 1992;39(1):51-9.
  24. Raybould HE, Li DS, Guth PH. Calcitonin gene-related peptide mediates the gastric hyperemic response to acid back-diffusion. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;657:536-7.
  25. Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity from thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 1991;43:143-201.
  26. Grider JR. CGRP as a transmitter in the sensory pathway mediating peristaltic reflex. *Am J Physiol*. 1994;266(6 Pt 1):G1139-45.
  27. Sternini C, Reeve JR Jr, Brecha N. Distribution and characterization of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the digestive system of normal and capsaicin-treated rats. *Gastroenterology*. 1987;93(4):852-62.
  28. Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, et al.. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest*. 2004;114(1):57-66.
  29. Konturek PC, Brzozowski T, Pajdo R, et al. Ghrelin-a new gastroprotective factor in gastric mucosa. *J Physiol Pharmacol*. 2004;55(2):325-36.
  30. Jaworek J, Bonior J, Leja-Szpak A, et al. Sensory nerves in central and peripheral control of pancreatic integrity by leptin and melatonin *J Physiol Pharmacol*. 2002;53(1):51-74.
  31. Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, et al. Stimulation of sensory nerves and CGRP attenuate pancreatic damage in ischemia/reperfusion induced pancreatitis. *Med Sci Monit*. 2003;9(12):BR418-25.
  32. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, et al. Exogenous and endogenous ghrelin in gastroprotection against stress-induced gastric damage. *Regul Pept*. 2004;120(1-3):39-51.
  33. Kojima M, Hosoda H, Kangawa K. Clinical endocrinology and metabolism. Ghrelin, a novel growth-hormone-releasing and appetite-stimula
  34. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma

- ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*. 2001;50(8):1714-1719.
35. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, et al. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest*. 2002;24(6):RC19-21.
  36. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2000;407(6806):908-13.
  37. Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, et al. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(8):3997-4000.
  38. Broglio F, Benso A, Gottero C, et al. Effects of glucose, free fatty acids or arginine load on the GH-releasing activity of ghrelin in humans. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;57(2):265-71.
  39. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, 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):240-244.
  40. Cuntz U, Fruhauf E, Wawarta R, et al. A role for the novel weight-regulating hormone ghrelin in anorexia nervosa. *Am Clin Lab*. 2002;21(4):22-3.
  41. Monteleone P, Martiadis V, Fabrazzo M, Serritella C, Maj M. Ghrelin and leptin responses to food ingestion in bulimia nervosa: implications for binge-eating and compensatory behaviours. *Psychol Med*. 2003;33(8):1387-1394.
  42. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;279(3):909-13.
  43. Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem*. 2003;278(1):64-70.
  44. Basa NR, Wang L, Arteaga JR, Heber D, Livingston EH, Tache Y. Bacterial lipopolysaccharide shifts fasted plasma ghrelin to postprandial levels in rats. *Neurosci Lett*. 2003;343(1):25-8.
  45. Laye S, Gheusi G, Cremona S, et al. Endogenous brain IL-1 mediates LPS-induced anorexia and hypothalamic cytokine expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279(1):R93-8.
  46. Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, et al. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med*. 1997;185(1):171-5.