

Grelina jest 28 aminokwasowym peptydem z grupą n-oktanylową w pozycji Ser³ na N-końcu molekuly. Ta specyficzna postranslacyjna modyfikacja łańcucha węglowego jest wymagana dla biologicznej aktywności peptydu. Grelina jest naturalnym ligandem dla receptora hormonu wzrostu GHS-R typu 1a i 1b, ale jej aktywność nie ogranicza się do osi podwzgórze-przysadka. Sugeruje się, iż grelina jest pierwszym aktywnym systemowo hormonem oreksygenym, stymulującym przyrost masy ciała poprzez większe spożycie pokarmu, jak również zmniejszającym użytkowanie tkanki tłuszczowej w warunkach negatywnego bilansu energetycznego organizmu. Wykazuje również działanie ochronne na przewód pokarmowy zmniejszając uszkodzenia błony śluzowej żołądka w przypadku jej ekspozycji na działanie czynników wrzodotwórczych. W żołądkach szczurów grelina stymuluje uwalnianie gastryny i pobudza sekrecję soku żołądkowego i motorykę. Obserwowane efekty dotyczą badań na dorosłych lub młodych zwierzętach, badania na nowo narodzonych zwierzętach są nieliczne i ograniczają się do szczurów i kurcząt. W badaniach na ssących szczurach obserwowano brak wpływu na masę ciała, oraz zahamowanie rozwoju błony śluzowej żołądka i trzustki. Odwrócenie tych efektów obserwowano u 7-tygodniowych szczurów, co wskazuje na dualne działanie greliny w zależności od wieku jak również od pobieranego pokarmu. Rola greliny w rozwoju przewodu pokarmowego u nowo narodzonych prosiąt jest nieznana, jednakże wysoka ekspresja greliny i receptora dla greliny w tkankach płodu i noworodków sugeruje jej znaczenie w rozwoju przewodu pokarmowego.

Celem pracy było poznanie wpływu egzogennej greliny na rozwój układu pokarmowego u nowo narodzonych prosiąt, a w szczególności na błonę śluzową jelita cienkiego. Do realizacji tego celu poza podaniem egzogennej greliny użyto także farmakologicznego antagonisty receptora grelinowego. Użycie specyficznego antagonisty miało pomóc rozstrzygnąć czy obserwowane zmiany w błonie śluzowej jelita cienkiego są wywoływane poprzez receptor grelinowy.

Szczegółowe cele niniejszej pracy doktorskiej obejmowały:

1. Analizę stężenia greliny całkowitej i aktywnej w osoczu krwi i mleku loch, w osoczu u nowo narodzonych prosiąt i w preparatach mlekozastępczych dla prosiąt oraz zbadanie ewentualnych zależności pomiędzy stężeniem greliny w osoczu i mleku loch oraz stężeniem greliny w osoczu u prosiąt.
2. Określenie wpływu egzogennej greliny oraz blokady receptora grelinowego na parametry morfometryczne narządów przewodu pokarmowego (żołądka, jelita cienkiego, trzustki i wątroby) u nowo narodzonych prosiąt.
3. Określenie kinetyki dojrzewania błony śluzowej jelita cienkiego u prosiąt otrzymujących egzogenną grelinę oraz antagonistę receptora grelinowego przy użyciu następujących markerów:
 - a. tempo wzrostu błony śluzowej i mięśniowej,
 - b. tempo dojrzewania komórek nabłonka (analiza lizosomalnych wakuoli w enterocytach),
 - c. dynamika aktywności enzymów rąbka szczoteczkowego.

4. Określenie wpływu podania egzogennej greliny na dynamikę przebudowy nabłonka jelita czczego u nowo narodzonych prosiąt techniką cytometrii tkankowej (pomiar indeksów: mitotycznego, apoptotycznego i autofagii).
5. Określenie wpływu podania egzogennej greliny na ekspresję białka p53 jako markera uszkodzeń DNA w enterocytach jelita czczego u nowo narodzonych prosiąt.
6. Badanie mechanizmów indukcji apoptozy w nabłonku jelita cienkiego u nowo narodzonych prosiąt - sprawdzenie na ile proces apoptozy jest indukowany poprzez ścieżkę receptorową. Ocena ilościowa udziału proapoptotycznych cytokin TGF- β 1 i TNF- α w procesie apoptozy u nowo narodzonych prosiąt.

Część doświadczalna pracy obejmowała trzy doświadczenia:

Doswiadczenie 1: Stężenie całkowitej i aktywnej formy greliny w sianie i mleku loch oraz osoczu krwi loch i prosiąt.

Oznaczenie stężenia całkowitej i aktywnej formy greliny w sianie i mleku loch w 1, 2, 4, 7, 14, 21 i 28 dniu laktacji (przed porannym karmieniem) oraz w komercyjnych preparatach mlekozastępczych dla prosiąt MilkyFarm (Nukamel Olen, Belgia) i Lakti R (Trouw Nutrition, Polfarm, Polska). Oszacowanie stężenia całkowitej i aktywnej greliny w osoczu krwi loch pobieranej z żyły brzeżnej ucha w 14 i 28 dniu laktacji. Oznaczono stężenia greliny w osoczu krwi prosiąt ssących w 1, 2, 4, 7 i 28 dniu życia prosięcia oraz u prosiąt z doświadczenia 2 oraz 3. Stężenie greliny mierzono przy użyciu komercyjnie dostępnych testów radioimmunologicznych (RIA) Linco Research Inc. (St. Louis, MO, USA) dla całkowitej formy (Ghrelin Total RIA Kit) i aktywnej formy greliny (Ghrelin Active RIA Kit).

Doświadczenie 2: Wpływ egzogennej greliny na rozwój jelita cienkiego u nowo narodzonych prosiąt

Doświadczenie zostało przeprowadzone na prosiętach płci męskiej, krzyżówek towarowych (Duroc x polska biała zwisłoucha), podzielonych losowo na trzy grupy doświadczalne:

- Grupa kontrolna (C7, n=10) otrzymywała sondą do żołądka 5 ml roztworu soli fizjologicznej (0,9% NaCl, Polfa, Łódź, Polska) co 8 godzin ok. 30 minut po podaniu pokarmu przez 6 dni.
- Grupa otrzymująca egzogenną grelinę w dawce 7,5 μ g/kg masy ciała (G7,5, n=6) zawieszoną w 5 ml 0,9% NaCl. Grelina była podawana sondą do żołądka co 8 godzin ok. 30 minut po podaniu pokarmu przez 6 dni.
- Grupa otrzymująca egzogenną grelinę w dawce 15 μ g/kg masy ciała (G15, n=10) zawieszoną w 5 ml 0,9% NaCl. Grelina była podawana sondą do żołądka co 8 godzin ok. 30 minut po podaniu pokarmu przez 6 dni.

W doświadczeniu wykorzystano egzogenną syntetyczną grelinę o sekwencji aminokwasów szczurzej greliny podarowaną na cele badawcze przez profesorów Ikuo Kato (Yanaihara Institute, Japonia) i Atsukazu Kuwahara (Shizuoka University, Japonia).

Doświadczenie 3: Określenie mechanizmu działania egzogennej greliny z zastosowaniem antagonisty receptora dla greliny, [D-Lys3]-GHRP-6.

Doświadczenie zostało przeprowadzone na prosiętach płci męskiej, krzyżówek towarowych (Duroc x polska biała zwisłoucha), podzielonych losowo na dwie grupy doświadczalne:

- Grupa RA (n=6) otrzymywała 100 nmol/kg masy ciała zawiesinę antagonisty receptora grelinowego [D-Lys-3]GHRP-6 w 5 ml NaCl (0,9%, Polfa) podaną sondą do żołądka co 8 godzin, 30 minut po podaniu pokarmu przez 6 dni.
- Grupa RAG15 (n=6) otrzymywała wyżej opisaną zawiesinę antagonisty receptora grelinowego (100 nmol/kg masy ciała) oraz grelinę (15 µg/kg masy ciała). Antagonistę receptora grelinowego podawano sondą do żołądka co 8 godzin, 30 minut po podaniu pokarmu przez 6 dni. Grelinę podawano sondą do żołądka w około 30 minut po każdym podaniu farmakologicznego antagonisty receptora grelinowego.

W doświadczeniu użyto antagonisty receptora dla greliny [D-Lys-3]GHRP-6 (Peptide Int, Louisville, Kentucky, USA). Wykorzystano również egzogenną syntetyczną grelinę o sekwencji aminokwasów szczurzej greliny (Yanaihara Institute, Japan) w wyższej z dawek zastosowanych w doświadczeniu 2 (15 µg/kg masy ciała).

Wyniki badań własnych nad rolą egzogennej greliny w rozwoju struktury i funkcji przewodu pokarmowego, a w szczególności w rozwoju błony śluzowej jelita cienkiego u nowo narodzonych prosiąt pozwalają stwierdzić, że:

- Siara i mleko loch zawierają znaczące ilości całkowitej i aktywnej formy greliny, a jej poziom nie zmienia się istotnie w czasie pierwszego miesiąca laktacji.
- Badane preparaty mlekozastępcze zawierają istotnie mniej całkowitej i aktywnej greliny w porównaniu do mleka loch.
- Stężenie aktywnej greliny w osoczu prosiąt ssących matkę jest istotnie wyższe w 7 dniu życia w porównaniu do 1 i 2 dnia życia co sugeruje, że grelina mleka może mieć udział w kształtowaniu puli osoczowej greliny.
- Podanie greliny do żołądka hamuje dynamikę przyrostów masy ciała, zmniejsza masę wątroby i trzustki oraz długość jelita cienkiego. Podanie farmakologicznego antagonisty receptora grelinowego nie znosi tych efektów.
- Podanie greliny do żołądka wywiera efekt troficzny na ścianę żołądka. Efekt ten dotyczy tylko błony mięśniowej i jest znoszony podaniem farmakologicznego antagonisty receptora grelinowego.
- Podanie greliny do żołądka powoduje zmiany w obrazie histologicznym błony śluzowej jelita cienkiego, co wraz z oceną stopnia zwakuolizowania

enterocytów i zawartości białka całkowitego w homogenatach błony śluzowej może świadczyć o ograniczeniu czynności enterocytów. Otrzymane wyniki sugerują, że egzogenna grelina może spowalniać kinetykę dojrzewania błony śluzowej.

- Podanie greliny do żołądka powoduje spowolnienie proliferacji komórek nabłonka krypt w jelicie cienkim z jednoczesnym wzrostem indeksu apoptotycznego i autofagii po zastosowaniu wyższej dawki greliny, co koresponduje z obrazem histologicznym błony śluzowej jelita. Wszystkie te efekty są w pełni odwracane podaniem antagonisty receptora grelinowego.
- Grelina indukuje ścieżkę receptorową apoptozy w enterocytach zależną od TNF- α i TGF- β 1.
- Podanie greliny do żołądka wzmacnia liczbę uszkodzeń DNA w nabłonku jelitowym, o czym świadczy wzmożona ekspresja białka p53 korespondująca ze zwiększoną ekspresją aktywnej kaspazy - 3 w enterocytach krypt jelitowych. Ten anty-cytoprotekcyjny efekt greliny jest całkowicie znoszony podaniem farmakologicznego antagonisty receptora grelinowego.

Obraz zmian histologicznych, immunohistochemicznych, aktywności enzymów rąbka szczoteczkowego wywołanych podaniem egzogennej greliny oraz możliwość ich zablokowania podaniem farmakologicznego antagonisty receptora grelinowego dowodzi, że grelina siary i mleka spowalnia procesy przebudowy nabłonka, a w konsekwencji także proces dojrzewania jelita u nowo narodzonych prosiąt.