Edyta Gurgul

Ekspresja ghreliny i obestatyny w różnych stanach funkcjonalnych tarczycy

Rozprawa doktorska

Promotor:
dr hab. n. med. Marek Ruchała, prof. UM

Katedra i Klinika Endokrynologii,
Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2011

Składam serdeczne podziękowania

Promotorowi - Prof. Markowi Ruchale
za kształtowanie mojej postawy naukowej,
za pomoc w wyborze tematu rozprawy
oraz za wsparcie i cenne rady w trakcie prowadzenia badań

Kierownikowi Katedry i Kliniki Endokrynologii,
Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych - Prof. Jerzemu Sowińskiemu
za życzliwość i umożliwienie realizacji badań

Prof. Jerzemu Kosowiczowi i Prof. Andrzejowi Łukaszykowi
za poświęcony czas i inspirujące dyskusje

Pracownikom Katedry i Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii
i Chorób Wewnętrznych oraz Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii
za otwartość, serdeczność i pomoc w przeprowadzaniu badań

Rozprawę doktorską dedykuję moim Rodzicom

- Celinie i Kryspinowi Gurgulom

SPIS TREŚCI

ZASTOSOWANE SKRÓTY 6
1 WSTĘP 10
1.1 Synteza ghreliny i obestatyny 11
1.2 Ekspresja tkankowa ghreliny 15
1.3 Ekspresja tkankowa obestatyny 18
1.4 Receptory ghreliny 19
1.5 Receptor obestatyny 21
1.6 Regulacja wydzielania ghreliny 21
1.7 Regulacja wydzielania obestatyny 25
1.8 Aktywność biologiczna ghreliny 27
1.8.1 Ghrelina a hormon wzrostu 27
1.8.2 Ghrelina a pozostałe hormony 28
1.8.3 Ghrelina a stan metaboliczny organizmu 30
1.8.4 Ghrelina a układ pokarmowy 32
1.8.5 Pozostałe działania ghreliny 33
1.8.6 Ghrelina nieacylowana 34
1.9 Aktywność biologiczna obestatyny 34
1.9.1 Obestatyna a apetyt i masa ciała 34
1.9.2 Obestatyna a przewód pokarmowy 36
1.9.3 Obestatyna a hormon wzrostu 36
1.9.4 Obestatyna a proliferacja komórkowa 37
1.10 Tarczyca a regulacja metabolizmu 37
1.10.1 Tarczyca – anatomia i fizjologia 37
1.10.2 Regulacja przemiany materii i rola tarczycy 40
1.10.3 Zaburzenia funkcji tarczycy 42
2 ZAŁOŻENIA I CEL PRACY 44
3 MATERIAŁY I METODY 46
3.1 Analiza stężeń ghreliny i obestatyny w osoczu 46
3.1.1 Grupa badana 46
3.1.2 Grupa kontrola 47
3.1.3 Metodyka badań 48
3.2 Tkankowa ekspresja ghreliny i obestatyny w tarczycy 50

3.2.1 Materiał ... 50
3.2.2 Metodyka badań immunohistochemicznych ... 51
3.3 Metody statystyczne ... 52
4 WYNIKI ... 53
4.1 Analiza stężeń ghreliny i obestatyny w osoczu ... 53
4.2 Tkankowa ekspresja ghreliny i obestatyny w tarczycy ... 63
5 DYSKUSJA ... 66
6 PODSUMOWANIE I WNIOSKI ... 85
7 PIŚMIENNICTWO ... 86
STRESZCZENIE ... 115
SUMMARY ... 118
SPIS TABEL ... 121
SPIS RYCIN ... 122
ZAŁĄCZNIKI ... 124

ZASTOSOWANE SKRÓTY

ABC – technika badań immunohistochemicznych oparta na tworzeniu kompleksu awidyna - biotynylowana peroksydaza (ang. avidin - biotyn - peroxidase complex)
ACN - acetonitryl
ACTH – hormon adrenokortykotropowy (kortykotropina)
AgRP - białko Agouti (ang. Agouti-related peptide)
AN – anoreksja (ang. anorexia nervosa)
(komórki) APUD – komórki rozproszonego układu endokrynnego, komórki gromadzące i dekarboksylujące prekursory amin katecholowych (ang. amine-precursors-uptake-decarboxylation)
ARC – jądro łukowate podwzgórza (ang. arcuate nucleus)
aTg – przeciwciała przeciwko tyreoglobulinie
aTPO - przeciwciała przeciwko peroksydazie tarczycowej
BMI – wskaźnik masy ciała (ang. body mass index)
CART - transkrypt regulowany kokainą i amfetaminą
DIT - 3,5-dijodotyrozyna
D1, 2, 3, 4 – dejodynaza 1, 2, 3, 4
DMN - jądro grzbietowo-przyśrodkowe podwzgórza
EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy
ER – siateczka wewnątrzplazmatyczna (ang. endoplasmic reticulum)
fT_3 – wolna trójjodotyronina
fT_4 – wolna tyroksyna
GABA – kwas γ-aminomasłowy
GFR – współczynnik przesączania kłębuszkowego (ang. glomerular filtration rate)
GH – hormon wzrostu (ang. growth hormone)

GHD – somatotropinowa niedoczynność przysadki (ang. growth hormone deficiency)

GHRH – hormon uwalniający hormon wzrostu, somatoliberyna (ang. growth hormone releasing hormone)

GHRL – gen prepro-ghreliny (gen ghreliny)

GHRP - 1, 2, 6 – peptydowe czynniki uwalniające hormon wzrostu (sekretagogi hormonu wzrostu; ang. growth hormone releasing peptides)

GHS - czynniki uwalniające hormon wzrostu (sekretagogi hormonu wzrostu)

GHS-R - receptor sekretagogów hormonu wzrostu

GHS-R1a, GHS-R1b - podtypy receptora GHS-R

GLP-1R – receptor peptydu glukagonopodobnego

GLUT4 – transporter glukozy 4

GnRH - gonadoliberyna

GOAT - O-acyltransferaza ghreliny (ang. ghrelin O-acyltransferase)

GPR39 – receptor wstępnie uważany za receptor obestatyny

HDL - lipoproteina o wysokiej gęstości

HOMA-IR – wskaźnik insulinooporności

HT – hormony tarczycy

5-HT – 5-hydroksy – tryptamina (serotonina)

IGF-1 – insulinopodobny czynnik wzrostu 1

IL1 – interleukina 1

IL6 – interleukina 6

L-692,429 – niepeptydowe czynniki uwalniające hormon wzrostu (sekretagogi hormonu wzrostu)

LDL – lipoproteidy o niskiej gęstości

LH – hormon luteinizujący (lutropina)

MAPK – kinaza białkowa aktywowana przez miogeny (ang. mitogen-activated protein kinase)

MCT - transporter hormonów tarczycy (ang. monocarboxylate transporter - 8)

MIT - monojodotyrozyna

MK-0677 - niepeptydowy czynnik uwalniający hormon wzrostu (sekretagog hormonu wzrostu)

mRNA – matrycowy kwas rybonukleinowy

MTC – rak rdzeniasty tarczycy (ang. medullary thyroid cancer)

NAA – noradrenalina

NIS - symporter sodowo-jodkowy

NPY – neuropeptyd Y

OATP1C1 – transporter hormonów tarczycy (ang. organic acid transporter protein 1c1)

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PAF-acetylhydrolaza - acetylhydrolaza czynnika aktywującego płytki (ang. platelet-activating factor – acetylhydrolase)

PC1/3 - konwertaza 1/3

POMC – proopiomelanokortyna

PRL - prolaktyna

PVN - jądra okołokomorowe podwzgórza

PWS - zespół Prader-Willi

rhGH - rekombinowany GH

RIA - radioimmunologiczna metoda analizy

rT_3 – odwrotna trójjodotyronina (rewers – trójjodotyronina)

RQ – współczynnik oddechowy (ang. respiratory quotient)

RT-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją

SCF – czynnik wzrostu komórek pnia (ang. stem cell factor)

SD – odchylenie standardowe

T_2 - dijodotyronina

T_3 – trójjodotyronina

T_4 – tetrajodotyronina (tyroksyna)

TAG - trójglicerydy (triacyloglicerole)

TFA - kwas trifluorooctowy

Tg - tyreoglobulina

TM - domeny przezbłonowe

TNFα - czynnik martwicy guza (ang. tumor necrosis factor α)

TR - receptory hormonów tarczycy

TRAb – przeciwciała przeciwko receptorowi tyreotropiny

TRH – hormon uwalniajacy tyreotropinę (ang. thyreotropin releasing hormone)

TSH - hormon tyreotropowy (tyreotropina)

UPC - mitochondrialne białko rozprzęgające

USG - ultrasonografia

VHDL – lipoproteidy o bardzo wysokiej gęstości

VIP – wazoaktywny peptyd jelitowy (ang. vasoactive intestinal peptide)

VMN - jądro brzuszno-przyśrodkowe podwzgórza

1 WSTĘP

Ghrelina i obestatyna są peptydami pochodzącymi ze wspólnego prekursora – prepro-ghreliny. Ghrelina została odkryta jako pierwszy naturalny sekretagog hormonu wzrostu (czynnik uwalniający hormon wzrostu) (Kojima i wsp., 1999). Wielonarządowa ekspresja ghreliny, jak i jej receptorów pociągnęły za sobą badania, które udowodniły jej wszechstronną aktywność biologiczną. Wkrótce stwierdzono, że ghrelina jest m.in. kluczowym regulatorem procesów metabolicznych silnie stymulującym apetyt, przyrost masy ciała i motorykę przewodu pokarmowego (Broglio i wsp., 2001, Wren i wsp., 2001a, Barazzoni i wsp., 2004, Heijboer i wsp., 2006).

Drugi z peptydów - obestatyna od momentu wyizolowania w 2005r. budzi wiele kontrowersji (Zhang i wsp., 2005). W pierwotnym badaniu przeprowadzonym na zwierzętach powodowała zmniejszenie apetytu, hamowała przyrost masy ciała oraz spowalniała motorykę żołądka i jelit. Działanie obestatyny było zatem przeciwstawne w stosunku do jej siostrzanego peptydu.

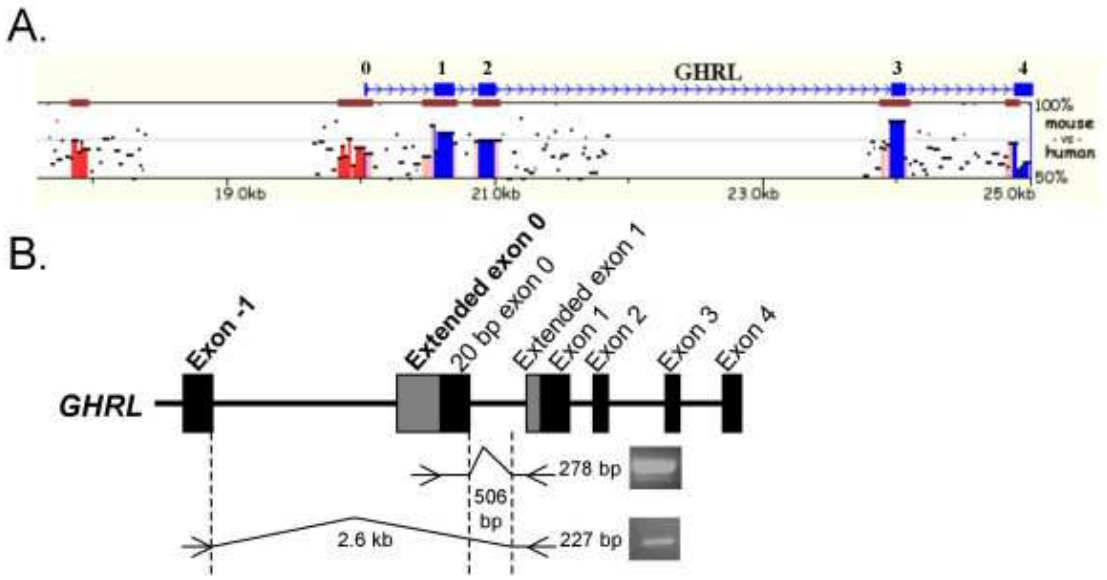
Pomimo, że niektóre późniejsze prace podały w wątpliwość antagonistyczne działanie ghreliny i obestatyny, ich wspólne pochodzenie sprawia, że nieustannie trwają poszukiwania podobieństw i różnic pomiędzy tymi peptydami. Zagadnienie to jest szczególnie interesujące w aspekcie regulacji procesów metabolicznych.

Zaburzenia funkcji tarczycy wiążą się z zachwianiem równowagi energetycznej organizmu. Nadczynność tarczycy prowadzi do przyspieszenia, a niedoczynność do spowolnienia tempa przemian metabolicznych. Nie można zatem wykluczyć, że istnieje powiązanie pomiędzy stanem funkcjonalnym tarczycy a produkcją i uwalnianiem ghreliny i obestatyny. Zależność ta jest tym bardziej prawdopodobna, że oprócz osi podwzgórzowo – przysadkowo - tarczycowej na czynność gruczołu tarczowego mogą wpływać także czynniki lokalne. Należy rozważyć więc, czy ghrelina i obestatyna biorą udział

w powstawaniu typowych objawów dysfunkcji tarczycy lub odwrotnie - czy peptydy te mogą być elementem mechanizmu kompensującego zaburzenia wywołane nadmiarem lub niedoborem hormonów tarczycy.

1.1 Synteza ghreliny i obestatyny

Gen prepro-ghreliny (gen ghreliny, *GHRL*) - prekursora ghreliny i obestatyny znajduje się na ramieniu krótkim chromosomu 3 (locus 3p 25-26). Składa się z czterech egzonów kodujących (1-4), krótkiego egzonu 0, egzonu -1 oraz trzech intronów (Seim i wsp., 2007) (ryc. 1).

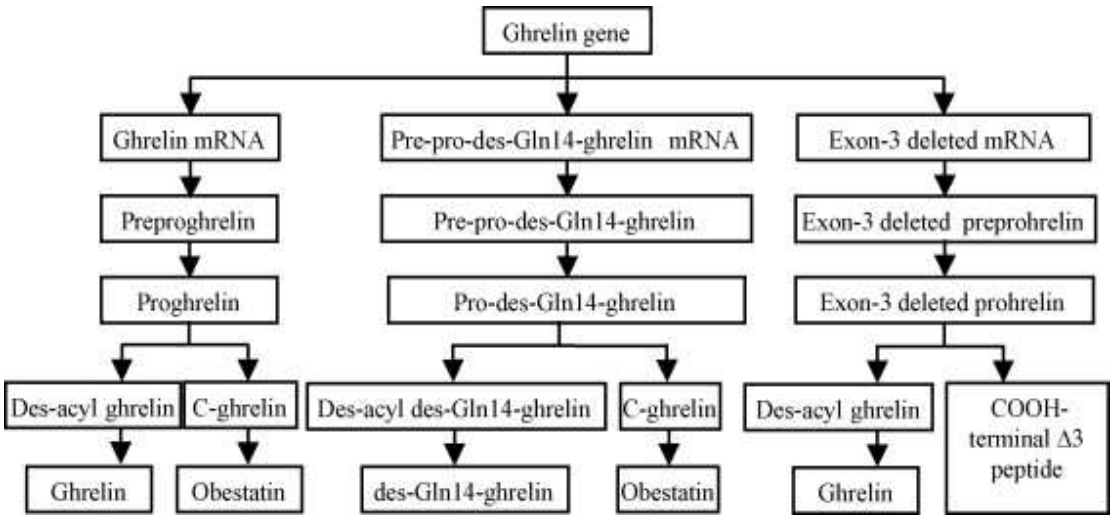


Ryc. 1 Struktura genu prepro-ghreliny (*GHRL*) wg Seim i wsp. (2007)

Opisano dwa miejsca inicjacji transkrypcji genu prepro-ghreliny: jedno w pozycji -80. i drugie w pozycji -555. w stosunku do kodonu inicjującego ATG. Istnieją zatem dwa różne transkrypty mRNA prepro-ghreliny – dominująca w organizmie człowieka forma A oraz forma B (Kanamoto i wsp., 2004).

Transkrypt A koduje prepro-ghrelinę składającą się z 23-aminokwasowego peptydu sygnałowego i 94-aminokwasowej proghreliny. W wyniku proteolizy z proghreliny powstają główne produkty końcowe - ghrelina (z egzonu 1 i 2) oraz obestatyna (z egzonu 3) (Seim i wsp., 2007) (ryc.

2). Enzymy biorące udział w tym etapie syntezy peptydów nie zostały jeszcze dokładnie określone. Najbardziej prawdopodobna, zwłaszcza w procesie powstawaniu cząsteczki ghreliny, jest rola konwertazy 1/3 (PC1/3) (Zhu i wsp., 2006).



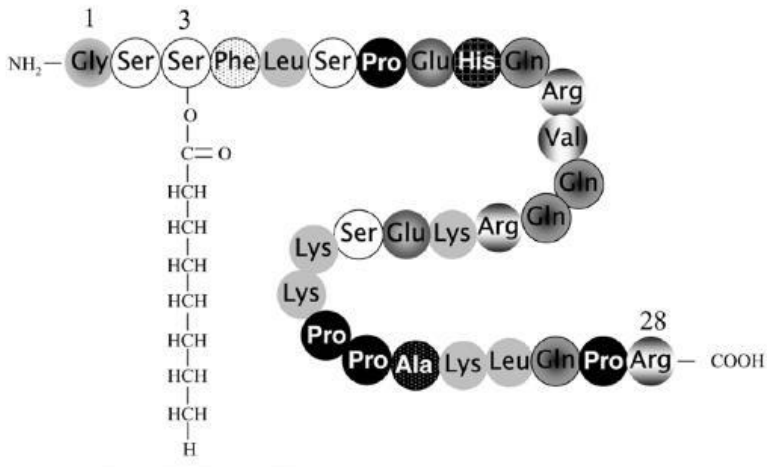
Ryc. 2 Produkty genu ghreliny wg Soares i Leite-Moreira (2008)

Ghrelina zaliczana jest do licznego grona hormonów peptydowych (ACTH, β-lipotropiny, enkefaliny, endorfiny, dynorfiny, cholecystokininy) powstających w wyniku proteolizy ich prekursora w miejscu sąsiadującym z lizyną lub argininą (Kakidani i wsp., 1982, Noda i wsp., 1982, Mains i wsp., 1983, Takahashi i wsp., 1985). Aminokwasy te przeważnie są usuwane z ostatecznego produktu. W przypadku proghreliny podział następuje najczęściej za Arg^{28}, dając 28-aminokwasową cząsteczkę ghreliny (fragment 1-28 proghreliny, masa cząsteczkowa 3314Da). Rzadziej w wyniku proteolizy przed Arg^{28} powstaje peptyd 27-aminokwasowy (Hosoda i wsp., 2003). Stosunek krótszej formy ghreliny do jej cząsteczki 28-aminokwasowej w głównym miejscu produkcji ghreliny - błonie śluzowej żołądka wynosi 1:3 (Hosoda i wsp., 2003).

Końcową modyfikacją syntezy ghreliny jest acylacja w pozycji Ser3 (Kojima i wsp., 2001). Zważywszy na fakt, że ghrelina jako jedyny peptyd

w organizmie człowieka podlega acylacji przez N-oktanowy kwas tłuszczowy, jest to proces unikatowy. Najczęściej w modyfikacji tej uczestniczy kwas kaprylowy (C8:0), ale może być on zastąpiony przez kwasy kaprynowy (C10:0) lub dekenowy (C10:1) (Hosoda i wsp., 2003) (ryc. 3). Acylacja zwiększa hydrofobowość cząsteczki ghreliny, co umożliwia aktywację jej receptora, a także wiązanie z białkami osocza (De Vriese i wsp., 2007). Enzymem odpowiedzialnym za tę modyfikację jest O-acyltransferaza ghreliny (GOAT, ghrelin O-acyltransferase) (Yang i wsp., 2008).

Biorąc pod uwagę długość łańcucha aminokwasowego formy ghreliny można zatem zakwalifikować do dwóch grup (28- lub 27-aminokwasowa cząsteczka ghreliny), a uwzględniając rodzaj acylacji cząsteczki ghreliny - do czterech grup (ghrelina nieacylowana, ghrelina acylowana kwasem kaprylowym, kaprynowym lub dekenowym). W organizmie człowieka wyizolowano wszystkie formy ghreliny. Cząsteczka 28-aminokwasowa acylowana przez kwas kaprylowy i jej forma nieacylowana występują jednak najczęściej (Hosoda i wsp., 2003).



Ryc. 3 Struktura cząsteczki ghreliny acylowanej kwasem kaprylowym wg Méndez-Sánchez i wsp. (2006).

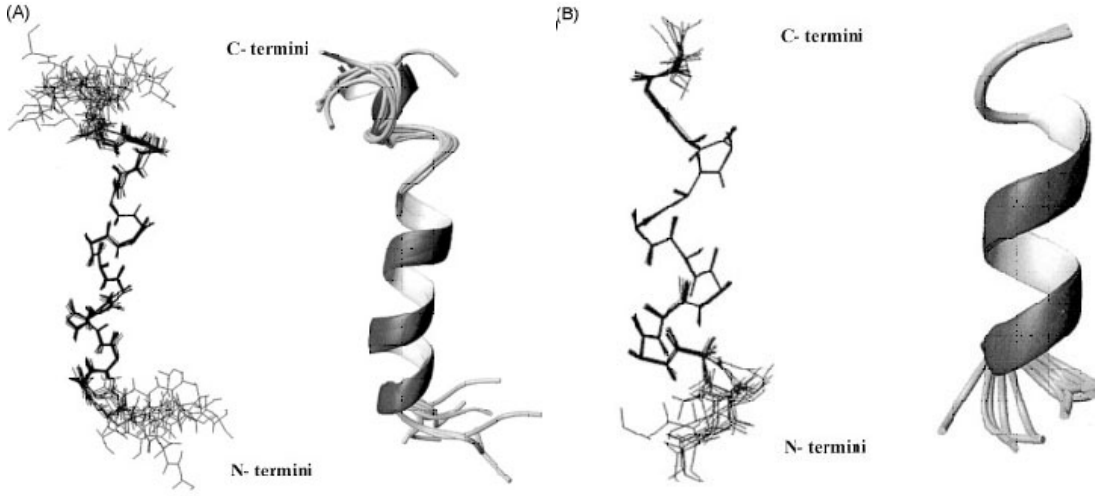
W żołądku stosunek ghreliny nieacylowanej do acylowanej wynosi 2:1. W osoczu natomiast forma nieacylowana stanowi zdecydowaną większość - ok. 90% (Hosoda i wsp., 2003, Bang i wsp., 2007). Wynika to głównie

z niestabilności ghreliny acylowanej i z natychmiastowego wiązania aktywnej formy peptydu przez receptory tkankowe (Hosoda i wsp., 2004, Akamizu i wsp., 2005).

W transporcie ghreliny acylowanej biorą udział trójglicerydy (TAG) oraz lipoproteiny o niskiej (LDL), wysokiej (HDL) i bardzo wysokiej gęstości (VHDL) (Beaumont i wsp., 2003, De Vriese i wsp., 2007). Ghrelina nieacylowana w osoczu występuje natomiast w formie niezwiązanej.

Nie zostało do końca wyjaśnione, czy ghrelina nieacylowana powstaje bezpośrednio z proghreliny, czy też w wyniku deacylacji ghreliny poprzednio zmodyfikowanej kwasem tłuszczowym. Biorąc pod uwagę drugą z hipotez, istnieje wiele prawdopodobnych enzymów mogących brać udział w procesie deacylacji np. butyrylcholinesteraza, PAF-acetylhydrolaza, karboksylesteraza, paraoksonaza I , które związane są z lipoproteinami wiążącymi ghrelinę acylowaną (Beaumont i wsp., 2003, De Vriese i wsp., 2007). Wykazano, że ghrelina inkubowana z poszczególnymi frakcjami lipidowymi wykazywała różnego stopnia skłonność do deacylacji - najsilniejszą pod wpływem LDL i VHDL, słabszą w obecności HDL, a znikomą po inkubacji z TAG (De Vriese i wsp., 2007). Cząsteczka ghreliny poddawana jest również procesowi deacylacji przed wydaleniem z organizmu przez nerki (De Vriese i wsp., 2004).

Drugim peptydem powstającym z prepro-ghreliny jest obestatyna. Jej 23-aminokwasowa cząsteczka pochodzi z C-końcowego fragmentu prekursora {76-98} (Zhang i wsp., 2005). Podobnie jak ghrelina, obestatyna również ulega posttranlacyjnej modyfikacji. W tym przypadku jest to amidacja motywu Gly-Lys C-końcowego fragmentu łańcucha aminokwasowego. Obestatyna ma strukturę α-helikalną. Składa się z dwóch domen, a integralność cząsteczki zapewniają wiązania wodorowe w obrębie helisy. Nagaray i wsp. wykazali, że cząsteczka obestatyny {1-23} może ulegać rozpadowi na dwa fragmenty {1-10} i {11-23} (Nagaraj i wsp., 2008) (ryc. 4).



Ryc. 4 Helikalna struktura fragmentu obestatyny {1–23} (A) i obestatyny {11-23}(B) wg Subasinghage i wsp. (2010)

Oprócz ghreliny i obestatyny produktami prepro-ghreliny mogą być również des-Gln^{14}-ghrelina i C-ghrelina. Des-Gln^{14}-ghrelina powstaje na skutek proteolizy rzadkiego wariantu proghreliny pozbawionej glutaminy w pozycji 14 (Hosoda i wsp., 2000). Wykazuje ona aktywność biologiczną równą ghrelinie i jest drugim endogennym ligandem dla receptorów sekretagogów hormonów wzrostu. U człowieka powstaje jednak w znikomych ilościach (Hosoda i wsp., 2003). Natomiast C-ghrelina jest 66-aminokwasowym fragmentem proghreliny {29-94} kodowanym przez egzon 2-4 (Seim i wsp., 2007). Może ona dawać początek innym peptydom, głównie obestatynie, ale także samodzielnie funkcjonować w osoczu.

1.2 Ekspresja tkankowa ghreliny

Ghrelina po raz pierwszy została wyizolowana z błony śluzowej żołądka szczura (Kojima i wsp., 1999). Stwierdzono jej obecność w tzw. komórkach X/A wchodzących w skład rozproszonego układu neuroendokrynnego. Komórki te w największej ilości występują w dnie żołądka, gdzie stanowią 20-25% komórek błony śluzowej (Date i wsp., 2000b). Badania nad ekspresją tkankową ghreliny u człowieka potwierdziły, że żołądek jest głównym miejscem jej produkcji. W tej

lokalizacji stwierdzono tzw. typ zamknięty komórek X/A. Położone są one głęboko w błonie śluzowej w pobliżu sieci naczyń krwionośnych blaszki właściwej, co sprawia, że produkowana w żołądku ghrelina uwalniana jest bezpośrednio do naczyń krwionośnych (Kojima i Kangawa, 2002). W dalszym odcinku przewodu pokarmowego liczba komórek zamkniętych stopniowo maleje, a w ich miejsce pojawiają się komórki otwarte. Występują one powierzchownie w błonie śluzowej i uwalniają ghrelinę do światła jelita (Kojima i Kangawa, 2002).

Gastrektomia redukuje poziom ghreliny osoczowej o ok. 65% (Ariyasu i wsp., 2001). Niemniej jednak dzięki produkcji tego peptydu w wielu innych narządach centralnych i obwodowych stężenie ghreliny szybko powraca do poziomu wyjściowego. Ekspresję ghreliny wykazano w podwzgórzu, przysadce, jelicie cienkim i grubym, wątrobie, trzustce, płucach, nerkach, nadnerczach, tarczycy, jajnikach, jądrach i wielu innych narządach (Date i wsp., 2000b, Hattori i wsp., 2001, Gnanapavan i wsp., 2002, Dixit i wsp., 2004, Ghelardoni i wsp., 2006, Raghay i wsp., 2006, Grönberg i wsp., 2008, Dagli i wsp., 2009, Ueberberg i wsp., 2009).

Obecność ghreliny stwierdzono ponadto w zmianach nowotworowych – głównie w guzach przysadki mózgowej, podwzgórza oraz guzach neuroendokrynnych przewodu pokarmowego i układu oddechowego (Papotti i wsp., 2001, Volante i wsp., 2002a, Volante i wsp., 2002b). Ekspresję peptydu wykazano także w innych guzach nowotworowych łagodnych i złośliwych m.in. w gruczolaku wątrobowokomórkowym, raku piersi i raku prostaty (Cassoni i wsp., 2001, Jeffery i wsp., 2002, Murata i wsp., 2002, Jeffery i wsp., 2005). Opisywano również przypadki guzów neuroendokrynnych o szczególnie zaznaczonej ekspresji ghreliny (ghrelinoma) (Corbetta i wsp., 2003, Tsolakis i wsp., 2004).

W życiu płodowym głównym źródłem ghreliny jest trzustka, gdzie ekspresja matrycowego RNA (mRNA) peptydu jest 6-7 razy większa niż w żołądku i zmniejsza się stopniowo dopiero po urodzeniu (Chanoine i Wong, 2004). Nie zbadano dotychczas, które komórki trzustki są odpowiedzialne za

produkcję ghreliny. Bierze się pod uwagę komórki α, β, niedawno odkryte komórki ε, ale rozważa się także udział nowego, dotychczas nie zbadanego trzustkowego źródła ghreliny (Date i wsp., 2002a, Volante i wsp., 2002a, Wierup i wsp., 2002, Prado i wsp., 2004). W życiu płodowym synteza ghreliny odbywa się także w płucach (Volante i wsp., 2002b), tarczycy (Volante i wsp., 2003), nerkach (Mori i wsp., 2000), łożysku (Gualillo i wsp., 2001), przysadce (Volante i wsp., 2009) i w jądrach płodów męskich (Tena-Sempere i wsp., 2002).

Ekspresja ghreliny w tarczycy

Kanamoto i wsp. (2001) jako pierwsi wykazali ekspresję ghreliny w tarczycy. Metodą Northern blot autorzy stwierdzili obecność mRNA peptydu w nowotworowej linii komórek C raka rdzeniastego tarczycy (komórkach TT). Wyniki te potwierdzono, oznaczając metodą radioimmunologiczną stężenie ghreliny wydzielanej przez komórki TT oraz oceniając ekspresję peptydu metodą immunohistochemiczną. Uzupełnieniem tych badań było stwierdzenie obecności genu ghreliny w komórkach C raka rdzeniastego tarczycy (Nakai i wsp., 2004).

Zespół Raghay (2006) metodami molekularnymi (RT-PCR) i immunohistochemicznymi wykazał ekspresję peptydu w komórkach raka brodawkowatego, pęcherzykowego i rdzeniastego, ale także w komórkach C zdrowej tarczycy. Nie stwierdzono natomiast obecności ghreliny w komórkach pęcherzykowych.

Ekspresję ghreliny w nowotworach złośliwych tarczycy potwierdzili również Zhang i wsp. (2006), wykazując metodą immunohistochemiczną obecność peptydu zarówno w raku brodawkowatym, pęcherzykowym, rdzeniastym, jak i anaplastycznym tarczycy.

Badania dotyczące obecności ghreliny w zdrowej tkance tarczycy, zapaleniach tarczycy i guzach łagodnych nie pozwoliły dotychczas na wyciągnięcie jasnych wniosków. Zhang i wsp. (2006) nie stwierdzili ekspresji ghreliny w podostrym zapaleniu tarczycy, zapaleniu typu Hashimoto, chorobie Graves-Basedowa, wolu guzowatym, ani w zdrowej tarczycy. Natomiast analiza odczynu immunohistochemicznego ghreliny w wolu guzowatym obojętnym

wykazała obecność ghreliny w komórkach parafolikularnych i, w mniejszym stopniu, folikularnych, co potwierdzono oceną ekspresji genu ghreliny techniką RT-PCR (Ruchała 2007). Karaoglu i wsp. (2009) zaobserwowali natomiast wyraźną ekspresję ghreliny w komórkach pęcherzykowych zdrowej tkanki tarczycy, w zapaleniu typu Hashimoto, a znacznie słabszą - w raku brodawkowatym tarczycy.

Zespół Volante (2003) badał występowanie ghreliny w zdrowej tarczycy dorosłego człowieka, guzach typu pęcherzykowego i w tarczycy płodowej. Na podstawie zastosowanych metod immunohistochemicznych oraz molekularnych (hybrydyzacja in situ oraz RT-PCR) autorzy wykazali silną ekspresję ghreliny w tarczycy płodowej. Natomiast w zdrowej tarczycy ludzi dorosłych nie stwierdzono obecności ghreliny. Do re-ekspresji peptydu dochodziło ponownie tylko w przypadku guzów folikularnych.

1.3 Ekspresja tkankowa obestatyny

Obestatyna została po raz pierwszy wyizolowana z błony śluzowej żołądka szczura (Zhang i wsp., 2005). Podobnie jak w przypadku ghreliny, także u ludzi żołądek jest głównym miejscem produkcji obestatyny (Furnes i wsp., 2008, Zhao i wsp., 2008). Wykazano, że u pacjentów po gastrektomii następuje znaczący spadek jej stężenia w osoczu (Furnes i wsp., 2008, Kim i wsp., 2009).

Odczyn immunohistochemiczny obestatyny poza żołądkiem jest wyraźnie słabszy (Volante i wsp., 2009). Ekspresję tego peptydu stwierdzono dotychczas w jelicie cienkim i grubym, tarczycy, trzustce oraz nabłonku przewodów mlekowych (Grönberg i wsp., 2008, Karaoglu i wsp., 2009, Volante i wsp., 2009). Występowanie obestatyny w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) jest przedmiotem dyskusji. Zespół Volante (2009) jako jedyny odnotował immunoreaktywność obestatyny w przysadce.

Ekspresję obestatyny stwierdzono również w tkankach nowotworowych - w guzach tarczycy, przytarczyc, trzustki i przewodu pokarmowego (Karaoglu i wsp., 2009, Tsolakis i wsp., 2009, Volante i wsp., 2009).

U płodu obestatynę wykazano w tych samych tkankach, w których w okresie prenatalnych obecna jest ghrelina - w trzustce, przewodzie pokarmowym, płucach, przysadce i tarczycy, przeważnie w koekspresji z chromograniną A (Volante i wsp., 2009).

Ekspresja obestatyny w tarczycy

Nieliczne prace podejmowały temat ekspresji obestatyny w tarczycy. Karaoglu i wsp. (2009) wykazali obecność ghreliny i obestatyny w zdrowej tkance tarczycy, zapaleniu typu Hashimoto oraz raku brodawkowatym tarczycy. Odczyn immunohistochemiczny obu peptydów w badanym materiale lokalizował się w obrębie komórek pęcherzykowych. Zespół Volante (2009) natomiast, analizując ekspresję obestatyny w guzach neuroendokrynnych, wykazał jej obecność w niektórych z badanych przypadków nowotworów tarczycy.

1.4 Receptory ghreliny

Ghrelina została odkryta jako pierwszy naturalny ligand dla receptora sekretagogów hormonu wzrostu (GHS-R) (Kojima i wsp., 1999). Wcześniej znane były tylko syntetyczne – peptydowe i niepeptydowe związki powodujące jego aktywację (Howard i wsp., 1996).

GHS-R jest receptorem związanym z białkiem G. Jego struktura aminokwasowa jest w ponad 50% homologiczna ze strukturą receptora dla neurotensyny i motyliny (Howard i wsp., 1996). Gen receptora GHS-R znajduje się na chromosomie 3 (locus 3q26.2) i składa się z dwóch egzonów (McKee i wsp., 1997). Jeden egzon koduje domeny przezbłonowe (TM) receptora od TM1 do TM5, a drugi TM6 i TM7. Znane są dwa warianty receptora GHS-R – 1a i 1b. GHS-R1a składa się z 366 aminokwasów i posiada 7 domen przezbłonowych. Receptor ten silnie wiąże ghrelinę i bierze udział w przekazywaniu jej działania biologicznego (Gnanapavan i wsp., 2002). Podtyp GHS-R1b powstaje w wyniku alternatywnej transkrypcji tylko pierwszego egzonu, stąd składa się wyłącznie z pięciu domen przezbłonowych i nie wykazuje aktywności biologicznej (Smith i wsp., 1999, Petersenn i wsp., 2001).

Aktywacja receptora GHS-R1a wyzwala sygnał zależny od fosfolipazy C, nasilając przemiany fosforanu inozytolu i aktywację kinazy C, co powoduje zwiększenie stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego (Kojima i wsp., 2001, Hosoda i wsp., 2003). Mechanizm ten różni się zatem od pobudzenia receptora GHRH, które uruchamia szlak kinazy A i zwiększa stężenie cAMP (Cheng i wsp., 1989).

Oba typy receptora ghreliny wykazują szeroką ekspresję narządową. GHS-R1a występuje głównie w przysadce mózgowej i podwzgórzu, ale także w innych obszarach mózgu – m.in. w hipokampie (Howard i wsp., 1996, Guan i wsp., 1997). Obwodowo GHS-R1a występuje w żołądku, jelicie cienkim i grubym, trzustce, płucach, sercu, nerkach, tarczycy, nadnerczach, gonadach i wielu innych narządach (Papotti i wsp., 2000, Hattori i wsp., 2001, Gnanapavan i wsp., 2002, Dixit i wsp., 2004, Leite-Moreira i Soares, 2007). Obecność receptora GHS-R1a we włóknach czuciowych nerwu błędnego świadczy o bliskim sąsiedztwie ich zakończeń z komórkami produkującymi ghrelinę i umożliwia przekazywanie działania ghreliny do OUN drogą włókien dośrodkowych (Date i wsp., 2002b, Burdyga i wsp., 2006).

Uważany za nieaktywny receptor GHS-R1b wykazuje jeszcze szerszą ekspresję narządową z największym nasileniem w przysadce mózgowej, skórze i myocardium (Papotti i wsp., 2000, Gnanapavan i wsp., 2002).

Obecność receptorów GHS-R1a i GHS-R1b w tarczycy została potwierdzona w licznych badaniach, metodami immunohistochemicznymi oraz molekularnymi (RT-PCR) (Cassoni i wsp., 2000, Papotti i wsp., 2000, Gnanapavan i wsp., 2002, Ruchała 2007, Ueberberg i wsp., 2009).

W związku z tym, że opisano efekty działania ghreliny także w tkankach nie wykazujących ekspresji receptora GHS-R1a, np. kardiomiocytach, sugeruje się istnienie dodatkowego, nie zbadanego do tej pory receptora ghreliny (Baldanzi i wsp., 2002). Dotychczas nie poznano również receptora ghreliny nieacylowanej. Wiadomo bowiem, że receptor GHS-R1a aktywowany jest wyłącznie przez ghrelinę zmodyfikowaną kwasem tłuszczowym (Hosoda i wsp., 2006).

1.5 Receptor obestatyny

Obestatyna początkowo została opisana jako pierwszy endogenny ligand dla sierocego receptora GPR39, który podobnie jak receptor GHS-R należy do rodziny receptorów motyliny i neurotensyny (Zhang i wsp., 2005). Niemniej w późniejszych badaniach nie stwierdzono wiązania obestatyny na komórkach wykazujących ekspresję receptora GPR39 (Lauwers i wsp., 2006, Chartrel i wsp., 2007, Holst i wsp., 2007, Trembley i wsp., 2007). Również Zhang i wsp. (2008) w swych późniejszych badaniach nie potrafili udowodnić ligacji obestatyny z tym receptorem. Zaobserwowano natomiast, że aktywację receptora, a w konsekwencji zwiększenie stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego powodują jony cynku mogące być ligandem lub modulatorem receptora GPR39 (Holst i wsp., 2007).

Trwają zatem poszukiwania receptora obestatyny. Wysunięto przypuszczenie, że peptyd ten może wiązać się z receptorem GLP-1R komórek β trzustki (Granata i wsp., 2008).

1.6 Regulacja wydzielania ghreliny

W związku z wpływem ghreliny na wydzielanie hormonu wzrostu wstępnie przypuszczano, że główna oś regulująca jej produkcję związana jest z komórkami somatotropinowymi. Dotychczasowe badania wykazały jednak, że wydzielanie ghreliny nie jest skorelowane ze stężeniem GH (Caminos i wsp., 2002, Freda i wsp., 2003). Stwierdzono natomiast, że produkcja ghreliny zależy w głównej mierze od stanu energetycznego organizmu, a jednym z ważniejszych czynników wpływających na jej poziom jest przyjmowanie pokarmu (Wren i wsp., 2001a, Wren i wsp., 2001b, Bagnasco i wsp., 2002).

Podstawowym stymulatorem produkcji ghreliny acylowanej i nieacylowanej jest głód, co sprawia, że wydzielanie ghreliny ma charakter pulsacyjny uzależniony od pór przyjmowania posiłków (Cummings i wsp., 2001, Cummings i wsp., 2004). Wysokie stężenie ghreliny na czczo ulega obniżeniu natychmiast po spożyciu pokarmu (Cummings i wsp., 2001, Shiiya i wsp., 2002).

Poposiłkowy spadek ghreliny dotyczy zarówno ghreliny acylowanej, jak i nieacylowanej (Barazzoni i wsp., 2007). Stężenie ghreliny acylowanej obniża się jednak wyraźnie szybciej (McCowen i wsp., 2002, Nakagawa i wsp., 2002, Shiiya i wsp., 2002, Bang i wsp., 2007). Fakt, że spożycie wody, czyli mechaniczne rozciągnięcie żołądka, nie redukuje poziomu ghreliny, dodatkowo świadczy o tym, że kluczowym czynnikiem hamującym produkcję ghreliny jest dostarczenie pokarmu o określonej wartości energetycznej (McCowen i wsp., 2002, Shiiya i wsp., 2002).

Stopień i długość trwania poposiłkowego spadku stężenia ghreliny zależy głównie od ilości spożytego pokarmu, ale także od rodzaju posiłku (Callahan i wsp., 2004). Najbardziej znacząca redukcja wydzielania ghreliny następuje po spożyciu węglowodanów, najmniejsza natomiast po przyjęciu pokarmu bogatolipidowego (Erdmann i wsp., 2003, Erdmann i wsp., 2004, Foster-Schubert i wsp., 2008). Z drugiej strony, należy wspomnieć, że spożycie średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych stymuluje acylację ghreliny i zwiększa pulę aktywnej ghreliny (Nischi i wsp., 2005)

Wbrew wstępnym przypuszczeniom poposiłkowy sygnał hamujący produkcję ghrelinę nie pochodzi z żołądka, ale z dalszego odcinka przewodu pokarmowego (Williams i wsp., 2003, Overduin i wsp., 2005). W badaniach na zwierzętach wykazano, że zablokowanie opróżniania żołądka opaską na odźwierniku nie powodowało spadku stężenia ghreliny po przyjęciu pokarmu (Williams i wsp., 2003). Wśród prawdopodobnych czynników wpływających na spadek produkcji ghreliny wymienia się osmolarność treści jelitowej i sygnał nerwowy pochodzący z jelit (Williams i wsp., 2003, Overduin i wsp., 2005, Cummings 2006).

Niektóre badania wskazują na odwrotnie proporcjonalną zależność pomiędzy ghreliną i insuliną (McCowen i wsp., 2002, Mohlig i wsp., 2002, Saad i wsp., 2002, Dezaki i wsp., 2004). U pacjentów z insulinoopornością w przebiegu otyłości i cukrzycy stwierdzono niskie stężenia ghreliny (Tschop i wsp., 2001b, Katsuki i wsp., 2004). Podobnie, porównanie stężeń ghreliny u pacjentów otyłych z insulinoopornością i otyłych z prawidłową

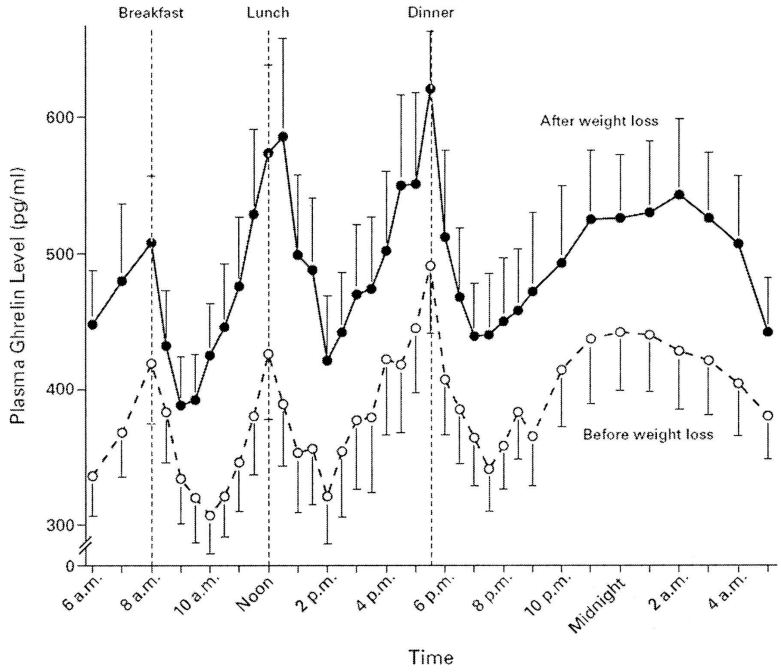
insulinowrażliwością wykazało niższe wartości w pierwszej podgrupie (McLaughlin i wsp., 2004). Stężenie ghreliny spada również w warunkach hipoglikemii poinsulinowej (Lucidi i wsp., 2002, Mohlig i wsp., 2002). O wzajemnej zależności pomiędzy insuliną i ghreliną może świadczyć fakt, że ścieżka sygnału zależnego od fosfolipazy C aktywowana przez receptor GHS-R1a związana jest także z rozwojem insulinooporności (Karasik i wsp., 1990, Pillay i wsp., 1990).

Leptyna będąca antagonistą ghreliny w zakresie odżywienia powoduje osłabienie apetytu. W badaniach u zwierząt i ludzi wykazano negatywną korelację pomiędzy stężeniami obu peptydów (Tschop i wsp., 2001a, Barazzoni i wsp., 2004). Leptyna może zatem zmniejszać apetyt, działając bezpośrednio na ośrodkowy układ nerwowy, ale także pośrednio, hamując produkcję ghreliny.

Zaobserwowano, że analogi somatostatyny powodują spadek stężenia ghreliny w osoczu (Broglio i wsp., 2002, Norrelund i wsp., 2002). W związku z tym, że ghrelina stymuluje produkcję somatostatyny, nie można wykluczyć sprzężenia zwrotnego pomiędzy tymi hormonami (Arosio i wsp., 2003).

Produkcja ghreliny podlega ponadto kontroli układu nerwowego. Stężenie peptydu odpowiednio wzrasta lub obniża się na skutek działania agonistów lub antagonistów receptorów muskarynowych (Broglio i wsp., 2004).

Przewlekłe zaburzenia stanu energetycznego organizmu wpływają na produkcję ghreliny jako długoterminowe czynniki regulujące. W otyłości – chorobie z dodatnim bilansem energetycznym obserwuje się niskie stężenia ghreliny ze zdecydowanie słabszym wzrostem stężenia peptydu na czczo, ale z zachowanym rytmem dobowym (Yildiz i wsp., 2004, Williams i Cummings, 2005) (ryc. 5). W tej grupie pacjentów stężenie ghreliny koreluje negatywnie ze wskaźnikiem masy ciała (BMI), tłuszczową masą ciała, a także poziomem leptyny i insuliny na czczo (Tschop i wsp., 2001b).



Ryc. 5 Dobowy profil stężeń ghreliny u chorych z otyłością przed i po redukcji masy ciała wg Williams i Cummings (2005).

Na drugim biegunie zaburzeń metabolicznych znajdują się stany z przewlekle ujemnym bilansem energetycznym tj. anorexia nervosa (AN), bulimia czy kacheksja w przebiegu chorób przewlekłych i nowotworowych.

Zarówno w anoreksji, jak i bulimii poziom ghreliny jest znacząco podwyższony (Shiiya i wsp., 2002, Scacchi i wsp., 2003) i negatywnie koreluje z BMI pacjentów (Tanaka i wsp., 2002, Tanaka i wsp., 2003a, Tanaka i wsp., 2003b, Troisi i wsp., 2005). Natomiast odpowiednie leczenie, którego efektem jest przyrost masy ciała, przywraca poziom ghreliny do wartości obserwowanych u osób zdrowych (Otto i wsp., 2001, Soriano-Guillén i wsp., 2004).

Stymulacja produkcji ghreliny następuje także u chorych z kacheksją w przebiegu chorób nowotworowych, przewlekłej niewydolności krążenia, niewydolności wątroby i nerek (Inui 1999, Yoshimoto i wsp., 2002, Tacke i wsp., 2003, Perez-Fontan i wsp., 2004, Garcia i wsp., 2005). Wobec osłabionego apetytu w chorobach przewlekłych zastanawiano się, czy hyperghrelinemia nie jest wynikiem braku poposiłkowego hamowania produkcji peptydu. Rzeczywistymi czynnikami nasilającymi wydzielanie ghreliny są jednak redukcja masy ciała i niedobory energetyczne. Potwierdziły to badania

przeprowadzone u osób redukujących masę ciała na drodze ćwiczeń gimnastycznych przy niezmienionej diecie, gdzie wykazano stopniowy wzrost stężenia ghreliny (Foster – Schubert i wsp., 2004, Cummings 2006).

Wobec powyższych obserwacji, zaskakującym jest fakt, że w zespole Prader-Willi (PWS), który oprócz somatotropinowej niedoczynności przysadki i hipogonadyzmu hypogonadotropowego charakteryzuje się nadmiernym apetytem i otyłością, stężenie ghreliny jest wysokie (Cummings i wsp., 2002). Odrzucono hipotezę, że hyperghrelinemia u tych pacjentów wynika z reakcji na niedobór hormonu wzrostu (Haqq i wsp., 2003). Leczenie rekombinowanym hormonem wzrostu nie obniżało bowiem stężenia ghreliny. Dodatkowo, zaobserwowano, że u dzieci z PWS po posiłku poziom ghreliny spada (Bizzarri i wsp., 2004), natomiast u dorosłych pozostaje niezmiennie wysoki (DelParigi i wsp., 2002). Nie wyjaśniono dotychczas mechanizmu patofizjologicznego tych zjawisk. Być może analiza przyczyn nadmiernego apetytu będącego elementem zespołu dostarczy wyjaśnień.

1.7 Regulacja wydzielania obestatyny

Zhang i wsp. (2005) w swoim odkrywczym badaniu stwierdzili, że rytm wydzielania obestatyny u szczurów pokrywa się z pulsacyjnym wydzielaniem ghreliny i jest zależny od przyjmowania posiłków. Podobne obserwacje zawarto w kilku późniejszych pracach (Zizzarri i wsp., 2007, Guo i wsp., 2008, Nakahara i wsp., 2008, St-Pierre i wsp., 2010). Równolegle przebiegające zmiany stężeń ghreliny i obestatyny w osoczu rozumiane były jako konsekwencja wspólnego pochodzenia obu peptydów.

Nie wszystkie badania potwierdziły jednak zależność wydzielania obestatyny od przyjmowania pokarmu. Poposiłkowego spadku obestatyny nie odnotowano u chorych z cukrzycą typu 2 (St-Pierre i wsp., 2010). Niektórzy autorzy podali wręcz w wątpliwość jakikolwiek wpływ przyjmowania pokarmu na produkcję obestatyny, wykazując, że głód nie stymuluje jej produkcji, a posiłek powoduje niewielki spadek jej wydzielania lub nie odgrywa żadnej roli (Bang i wsp., 2007, Guo i wsp., 2007, Huda i wsp., 2007).

Stwierdzono natomiast, że u chorych z insulinoopornością stężenie obestatyny jest niższe niż u osób zdrowych (Anderwald-Stadler i wsp., 2007, Qi i wsp., 2007). Zaobserwowano również, że poziom obestatyny u pacjentów z prawidłową insulinowrażliwością po podaniu insuliny egzogennej obniża się (Anderwald-Stadler i wsp., 2007). Zabieg taki nie zmieniał stężenia obestatyny u chorych z insulinoopornością. Zasugerowano zatem wpływ samej insuliny i insulinowrażliwości na produkcję obestatyny. Niektóre późniejsze badania potwierdziły odwrotnie proporcjonalną zależność pomiędzy stężeniem obestatyny a poziomem insuliny w osoczu (Qi i wsp., 2007, Lippl i wsp., 2008, Nakahara i wsp., 2008).

Przewlekłe zaburzenia stanu metabolicznego organizmu również wydają się wpływać na stężenie obestatyny w osoczu. Większość prac wykazała zahamowanie produkcji tego peptydu u chorych z otyłością (Guo i wsp., 2007, Huda i wsp., 2007, Zamrazilová i wsp., 2008, Beasley i wsp., 2009) oraz wzrost wydzielania u chorych z anoreksją (Harada i wsp., 2008, Nakahara i wsp., 2008, Zamrazilová i wsp., 2008, Germain i wsp., 2010). Wskazywałoby to na negatywną korelację pomiędzy obestatyną a BMI osób badanych, podobnie jak w przypadku ghreliny (Guo i wsp., 2007, Huda i wsp., 2007, Zamrazilová i wsp., 2008, Beasley i wsp., 2009). Odmiennych wniosków dostarczyła jedynie praca zespołu Vincenatti (2007), w której wykazano, że poziom obestatyny w otyłości wzrasta, obniżając stosunek stężeń ghreliny do obestatyny oraz badanie Monteleone i wsp. (2008), którzy zaobserwowali, że w anoreksji dochodzi do wzrostu stężenia ghreliny przy spadku poziomu obestatyny w osoczu.

Dotychczas tylko w jednej pracy analizowano stężenie obestatyny w zaburzeniach czynności tarczycy (Kosowicz i wsp., 2010). Wykazano, że w niedoczynności tarczycy dochodzi do wzrostu, a w nadczynności tarczycy do spadku wydzielania tego peptydu. Ponadto zaobserwowano, że stosunek ghrelina/obestatyna w niedoczynności tarczycy jest wyższy niż u osób zdrowych.

1.8 Aktywność biologiczna ghreliny

1.8.1 Ghrelina a hormon wzrostu

Do niedawna sądzono, że wydzielanie hormonu wzrostu (GH) przez komórki somatotropinowe przysadki regulowane jest głównie poprzez antagonistyczne działanie dwóch hormonów: somatoliberyny (GHRH) i somatostatyny. Od lat 70-tych XX wieku znane są również tzw. sekretagogi hormonu wzrostu (GHS) – substancje, które poprzez wiązanie z receptorem GHS-R stymulują produkcję GH. Do niedawna znane były tylko syntetyczne formy GHS - związki peptydowe (GHRP-1, GHRP-2, GHRP-6, hexarelina, ipamorelina i niepeptydowe (L-692,429, MK-0677) (Smith i wsp., 1999).

Poszukiwania endogennego liganda receptora GHS-R uwieńczyło w 1999r. wyizolowanie ghreliny – pierwszego naturalnego sekretagoga hormonu wzrostu (Kojima i wsp., 1999). Nazwa tego peptydu pochodzi od staroindoeuropejskiego słowa „ghre" oznaczającego „wzrost" i przyrostka „rhelin" oznaczającego „uwalnianie", co wskazuje na własności pobudzające wydzielanie GH.

Wykazano, że stymulujący wpływ ghreliny na produkcję GH u ludzi jest silniejszy nawet od działania GHRH (Arvat i wsp., 2000, Takaya i wsp., 2000) i zależy od stężenia peptydu (Date i wsp., 2000a, Malagón i wsp., 2003, Popovic i wsp., 2003). W badaniach eksperymentalnych zaobserwowano, że dożylne podanie ghreliny u ludzi powoduje znaczący wzrost stężenia GH w osoczu, a jednoczesne podanie ghreliny i GHRH wywołuje ich synergistyczne, wzmożone działanie (Takaya i wsp., 2000, Hataya i wsp., 2001).

Wzrost stężenia GH pod wpływem ghreliny w hodowli komórek somatotropinowych *in vitro* świadczy o bezpośrednim wpływie peptydu na przysadkę (Kojima i wsp., 1999). Niemniej jednak podwzgórze również odgrywa rolę w ghrelino-zależnej stymulacji GH. Pacjenci z ubytkami neurologicznymi w obrębie podwzgórza wykazują mniejszy wzrost GH po podaniu ghreliny

(Popovic i wsp., 2003). Ponadto, stymulacja GH pod wpływem ghreliny w badaniach na izolowanych komórkach somatotropinowych *in vitro* była zdecydowanie słabsza niż w badaniach *in vivo* (Popovic i wsp., 2003). Zatem droga do maksymalnej ghrelino-zależnej stymulacji GH prawdopodobnie wiedzie przez podwzgórze. Jedna z teorii głosi, że głównym elementem tego mechanizmu może być pobudzenie nerwu błędnego i aktywacja komórek somatotropinowych przysadki (Burdyga i wsp., 2006). Udowodniono bowiem, że ghrelina nasila ekspresję genu *c-Fos* w neuronach GHRH w jądrze łukowatym, a przecięcie nerwu błędnego u szczurów powoduje zanik tej stymulacji i osłabienie wzrostu GH po parenteralnym podaniu ghreliny (Date i wsp., 2002b).

1.8.2 Ghrelina a pozostałe hormony

Wpływ ghreliny na układ endokrynny u ludzi nie ogranicza się tylko do stymulacji wydzielania GH. W badaniach eksperymentalnych zaobserwowano, że moduluje ona czynność komórek lakto - i kortykotropowych, co powoduje nieznaczny wzrost stężenia prolaktyny (PRL), kortykotropiny (ACTH) i kortyzolu (Arvat i wsp., 2001). Ghrelina stymuluje wydzielanie tych hormonów poprzez bezpośrednie działanie na komórki przysadki, ale także pośrednio poprzez zahamowanie produkcji kwasu γ-aminomasłowego (GABA) i wpływ na podwzgórze (Cowley i wsp., 2003).

Ghrelina hamuje również oś podwzgórze - przysadka – gonady, zmniejszając produkcję gonadoliberyny (GnRH) w podwzgórzu i osłabiając odpowiedź hormonu luteinizującego (LH) na GnRH (Fernández - Fernández i wsp., 2005, Lanfranco i wsp., 2006). W gonadach męskich ghrelina działa ponadto jako inhibitor spermatogenezy (Barreiro i wsp., 2004). Zmniejsza ekspresję genu czynnika wzrostu komórek pnia (SCF) - kluczowego mediatora spermatogenezy i regulatora wzrostu komórek Leydiga.

Zależność pomiędzy ghreliną a czynnością tarczycy nie została jeszcze jasno określona. U chorych z nadczynnością tarczycy zaobserwowano, że stężenie ghreliny jest niższe niż u osób zdrowych (Riis i wsp., 2003, Giménez-

Palop i wsp., 2005, Rojdmark i wsp., 2005, Altinova i wsp., 2006a, Ruchała 2007, Braclik i wsp., 2008, Tanda i wsp., 2009, Theodoropoulou i wsp., 2009, Kosowicz i wsp., 2010). Skuteczna terapia tyreostatykiem powodowała natomiast normalizację stężenia ghreliny (Riis i wsp., 2003, Ruchała 2007, Tanda i wsp., 2009).

W większości badań dotyczących niedoczynności tarczycy stwierdzono podwyższone stężenie ghreliny (Ruchała 2007, Braclik i wsp., 2008, Gjedde i wsp., 2008, Kosowicz i wsp., 2010). Gjedde i wsp. (2008) wykazali również, że u pacjentów z hypotyreozą po leczeniu poziom ghreliny ulegał obniżeniu do wartości stwierdzanych u osób zdrowych.

Dotychczas w jednej pracy zaobserwowano, że u chorych z niedoczynnością tarczycy w przebiegu zapalenia tarczycy typu Hashimoto (przewlekłego zapalenia tarczycy, autoimmunologicznego zapalenia tarczycy) poziom ghreliny był niższy niż u osób zdrowych, korelował pozytywnie ze stężeniem wolnych hormonów tarczycy, negatywnie z poziomem przeciwciał przeciwko peroksydazie tarczycowej (aTPO), przeciwko tyreoglobulinie (aTg) i nie wzrastał po leczeniu (Altinova i wsp., 2006b).

Odnotowany przez Bergmann i wsp. (2003) spadek stężenia ghreliny w niedoczynności tarczycy nie był istotny statystycznie. Zespół Giménez-Palop (2005) nie wykazał z kolei różnic w stężeniu ghreliny pomiędzy grupą chorych z hypotyreozą a grupą kontrolną. Tanda i wsp. (2009) analizowali stężenie ghreliny u chorych z jawnymi i subklinicznymi zaburzeniami czynności tarczycy. Stwierdzili, że jawna nadczynność tarczycy wiąże się z obniżeniem stężenia ghreliny (całkowitej i acylowanej), które koreluje negatywnie z fT_3, fT_4 i normalizuje się po wyrównaniu czynności tarczycy (po uzyskaniu eutyreozy). Natomiast niedoczynność tarczycy i subkliniczna nadczynność nie powodowały zmian stężenia ghreliny. Sadegholvad i wsp. (2007) w swoim badaniu zaobserwowali, że w niedoczynności tarczycy stężenie ghreliny jest nieznacznie niższe niż u chorych z nadczynnością tarczycy. W obu grupach stężenie ghreliny wzrastało po leczeniu. Wyniki te jednak nie były istotne statystycznie (tab. 1).

Tab. 1 Stężenie ghreliny w osoczu krwi na czczo w różnych stanach czynnościowych tarczycy (pg/ml) (NS – nieistotne statystycznie).

Autor	Rok	Hypotyreoza	Hypertyreoza
Bergmann i wsp.	2003	↓ (NS)	-
Riis i wsp.	2003	-	↓
Giménez-Palop i wsp.	2005	bez zmian	↓
Rojdmark i wsp.	2005	-	↓
Altinova i wsp.	2006a	-	↓
Altinova i wsp.	2006b	↓	-
Ruchała	2007	↑	↓
Sadegdolvad i wsp.	2007	↑ (NS)	↑ (NS)
Braclik i wsp.	2008	↑	↓
Gjedde i wsp.	2008	↑	-
Tanda i wsp.	2009	bez zmian	↓
Theodoropoulou i wsp.	2009	-	↓

W badaniach na zwierzętach wykazano, że niedoczynność tarczycy wywołana doustnie podawanymi tyreostatykami stymuluje ekspresję ghreliny na poziomie genu, mRNA i białka (Caminos i wsp., 2002). Nadczynność tarczycy indukowana egzogenną L-tyroksyną wiązała się natomiast z obniżonym stężeniem ghreliny w osoczu zwierząt (Caminos i wsp., 2002) i nasiloną ekspresją receptora ghreliny GHS-R (Kamegai i wsp., 2001).

1.8.3 Ghrelina a stan metaboliczny organizmu

Głównym ośrodkiem kontrolującym apetyt jest podwzgórze. Wykazano, że wśród czynników stymulujących przyjmowanie pokarmu znajdują się sekretagogi hormonu wzrostu, w tym endogenna ghrelina (Inui 2001, Wren i wsp., 2001a, Lawrence i wsp., 2002, Schaller i wsp., 2003). Potwierdzeniem tego może być silna ekspresja peptydu i jego receptorów w głównych ośrodkach regulujących apetyt - jądrze łukowatym (ARC) i jądrach okołokomorowych podwzgórza (PVN) (Papotti i wsp., 2000, Gnanapavan i wsp., 2002).

Ghrelina wpływa na regulację apetytu drogą aferentnych włókien nerwu błędnego (Williams i wsp., 2003b), ale także drogą endo - , para – i autokrynową (Hewson i wsp., 2000, Couce i wsp., 2006). Neurony jądra łukowatego przesyłają sygnał do innych jąder (głównie jąder bocznych podwzgórza) mających stymulujący wpływ na przyjmowanie pokarmu (Toshinai i wsp., 2003). Prowadzi to do uwolnienia peptydów oreksygennych: neuropeptydu Y (NPY) i białka Agouti (AgRP) oraz do zahamowania działających anoreksygennie neuronów zawierających proopiomelanokortynę (POMC) oraz transkryptu regulowanego kokainą i amfetaminą (CART) (Schwarz i wsp., 2000, Chen i wsp., 2004).

Oreksygenne działanie ghreliny udowodniono w badaniach u zwierząt (Tschop i wsp., 2000, Asakawa i wsp., 2001, Nakazato i wsp., 2001, Wren i wsp., 2001b) i u ludzi (Wren i wsp., 2001a, Akamizu i wsp., 2004, Cummings 2006). Należy zaznaczyć, że w badaniach eksperymentalnych u zwierząt ghrelina była pierwszym peptydem stymulującym apetyt zarówno po podaniu centralnym, jak i obwodowym. Wcześniej poznane NPY, AgRP i oreksyny miały bowiem zdolność pobudzania apetytu tylko po podaniu dokomorowym. Nasilenie łaknienia, podobnie, jak stymulacja wydzielania GH, następuje w efekcie zależnym od dawki zastosowanej ghreliny (Tschop i wsp., 2000, Wren i wsp., 2000, Akamizu i wsp., 2004).

Wpływ ghreliny na gospodarkę węglowodanową odbywa się na kilku poziomach. Już na początkowym etapie sygnalizowania poziomu glikemii ghrelina moduluje czułość obwodowych neuronów czuciowych i hamuje aktywność neuronów ośrodkowych odbierających ten sygnał (Pénicaud i wsp., 2006, Wang i wsp., 2008). Ghrelina podnosi stężenie glukozy w osoczu również pośrednio poprzez pobudzanie wydzielania GH oraz, w mniejszym stopniu, ACTH, kortyzolu, adrenaliny (Malagón i wsp., 2003) i prawdopodobnie glukagonu (Salehi i wsp., 2004), które jak wiadomo są hormonami hiperglikemizującymi. Ponadto, efekt ten wynika z pobudzającego wpływu ghreliny na komórki wątrobowe w zakresie glukoneogenezy (Murata i wsp., 2002, Gauna i wsp., 2005).

Date i wsp. (2002a) metodą immunohistochemiczną wykazali koekspresję ghreliny i glukagonu w komórkach α trzustki. W tej samej pracy zasugerowano, że ghrelina może stymulować wydzielanie insuliny na drodze parakrynowej poprzez zwiększenie stężenie wapnia w cytoplazmie komórek β. Badania analizujące wpływ ghreliny na produkcję insuliny nie są jednoznaczne. Niemniej jednak wyniki wskazujące na ghrelinę jako inhibitora produkcji insuliny wydają się bardziej prawdopodobne (Broglio i wsp., 2001, Egido i wsp., 2002, Broglio i wsp., 2003, Reimer i wsp., 2003, Wang i wsp., 2010). Ghrelina wpływa na obwodowe działanie insuliny, zmniejszając jej hamujący wpływ na glukoneogenezę (Heijboer i wsp., 2006). Moduluje także aktywność insuliny poprzez redukcję wydzielania adiponektyny, która uwrażliwia komórki na insulinę (Ott i wsp., 2002). Zatem efektem działania ghreliny jest hiperglikemia, a z drugiej strony obniżenie stężenia insuliny, co dowodzi złożoności mechanizmów regulujących stan metaboliczny organizmu.

Ghrelina jest również długoterminowym regulatorem masy ciała. Jak wiadomo, redukcja i przyrost masy ciała powodują odpowiednio zwiększenie lub spadek wydzielania ghreliny (Cummings i wsp., 2004). Z drugiej strony podawanie ghreliny powoduje przyrost masy ciała nie tylko poprzez nasilenie apetytu, ale również poprzez wpływ na metabolizm lipidów. Wykazano, że u gryzoni długotrwałe podskórne podawanie ghreliny zwiększa objętość tkanki tłuszczowej (Tschop i wsp., 2000). Ghrelina wielokierunkowo stymuluje jej rozrost. Zwiększa ilość TAG w wątrobie kosztem mięśni szkieletowych (Barazzoni i wsp., 2004), stymuluje proliferację i różnicowanie preadipocytów (Kim i wsp., 2004, Muccioli i wsp., 2004), pobudza lipogenezę w zróżnicowanych adipocytach, m.in. poprzez zwiększony wychwyt glukozy zależny od insuliny i hamuje lipolizę (Thompson i wsp., 2004, Patel i wsp., 2006).

1.8.4 Ghrelina a układ pokarmowy

Dotychczasowe badania przeprowadzone na zwierzętach wykazały, że ghrelina podana zarówno obwodowo, jak i centralnie stymuluje wydzielanie

gastryny i soku żołądkowego (Lee i wsp., 2002). Ponadto, w efekcie zależnym od dawki przyspiesza motorykę żołądka (Masuda i wsp., 2000, Asakawa i wsp., 2001, Date i wsp., 2001, Dornonville i wsp., 2004, Tack i wsp., 2005, Tack i wsp., 2006) i jelit (Shimizu i wsp., 2006). W działaniu prokinetycznym pośredniczą cholinergiczne włókna muskarynowe nerwu błędnego, co potwierdza zniesienie powyższych efektów u gryzoni po obustronnej szyjnej wagotomii (Masuda i wsp., 2000, Date i wsp., 2001). O sile działania stymulacyjnego ghreliny na perystaltykę przewodu pokarmowego mogą świadczyć również badania eksperymentalne, w których ghrelina podawana dożylnie odwracała pooperacyjną niedrożność żołądka u zwierząt (Trudel i wsp., 2002, Trudel i wsp., 2003).

1.8.5 Pozostałe działania ghreliny

Ghrelina wykazuje wielokierunkową aktywność biologiczną. Wśród pozostałych najistotniejszych działań peptydu należy wymienić jej właściwości kardioprotekcyjne i wazodylatacyjne (Nagaya i wsp., 2001b, Wiley i Davenport, 2002, Tesauro i wsp., 2005), modulujący wpływ na czynność układu odpornościowego (Koo i wsp., 2001, Dixit i wsp., 2004, Li i wsp., 2004) oraz udział w mechanizmach poznawczych i behawioralnych podlegających kontroli hipokampa (Carlini i wsp., 2002, Carlini i wsp., 2004).

Wykazano również, ze ghrelina może wpływać na proliferację, różnicowanie oraz apoptozę komórek. Dotychczasowe badania w większości wskazują na proproliferacyjne działanie ghreliny zarówno w stosunku do komórek zdrowych narządów, jak i guzów nowotworowych (Baldanzi i wsp., 2002, Jeffery i wsp., 2002, Murata i wsp., 2002, Mazzocchi i wsp., 2004, Kim i wsp., 2004, Nanzer i wsp., 2004, Maccarinelli i wsp., 2005, Granata i wsp., 2006, Park i wsp., 2008).

Zahamowanie proliferacji komórkowej pod wpływem ghreliny zaobserwowano w raku piersi (Cassoni i wsp., 2001), raku drobnokomórkowym płuca (Cassoni i wsp., 2006) oraz w nowotworach złośliwych tarczycy (Volante i wsp., 2003). Wykazano ponadto, że ghrelina może wpływać hamująco na

proces nowotworzenia poprzez regulację czynników angiogenezy i spowolnienie proliferacji komórek śródbłonka (Baiguera i wsp., 2004, Conconi i wsp., 2004).

1.8.6 Ghrelina nieacylowana

Ghrelina nieacylowana, wbrew wstępnym przypuszczeniom, prawdopodobnie nie jest pozbawiona aktywności biologicznej. Istnieją doniesienia świadczące o jej działaniu hamującym apetyt i osłabiającym motorykę żołądka (Asakawa i wsp., 2005, Chen i wsp., 2005, Matsuda i wsp., 2006). Ponadto zaobserwowano, że ghrelina nieacylowana może wpływać na proliferację komórkową (Baldanzi i wsp., 2002, Cassoni i wsp., 2004, Cassoni i wsp., 2006, Granata i wsp., 2006) oraz czynność układu sercowo-naczyniowego (Bedendi i wsp., 2003).

1.9 Aktywność biologiczna obestatyny

Większość dotychczasowych badań analizujących właściwości biologiczne obestatyny została przeprowadzona na zwierzętach. Tylko nieliczne prace podejmowały temat działania obestatyny w organizmie człowieka. Pomimo homologii pomiędzy strukturą obestatyny u gryzoni i u człowieka (87%) efekty działania obserwowane u zwierząt najczęściej nie znajdowały potwierdzenia w badaniach u ludzi (Qi i wsp., 2007).

1.9.1 Obestatyna a apetyt i masa ciała

W niektórych badaniach eksperymentalnych obserwowano hamujący wpływ egzogennej obestatyny na apetyt u zwierząt (Zhang i wsp., 2005, Bresciani i wsp., 2006, Green i wsp., 2007, Lagaud i wsp., 2007, Nagaraj i wsp., 2008, Brunetti i wsp., 2009). Sibilia i wsp. (2006) wykazali, że obestatyna wprawdzie znacząco zmniejsza łaknienie u szczurów, ale tylko w początkowym etapie działania i nie powoduje spadku masy ciała. Zespół Zizzari (2007) stwierdził natomiast, że pomimo braku bezpośredniego wpływu na apetyt, obestatyna wykazuje właściwości modulujące działanie ghreliny w tym zakresie i zmniejsza uczucie głodu.

Większość badań analizujących wpływ obestatyny na przyjmowanie pokarmu początkowo przeprowadzano na głodzonych gryzoniach. Jak wiadomo, stan ten wiąże się z wysokim stężeniem ghreliny w osoczu, więc jej oreksygenne działanie mogło maskować hamujący wpływ obestatyny na przyjmowanie pokarmu. Oczekując bardziej wiarygodnych wyników, przeprowadzono badania na zwierzętach pozbawionych genu ghreliny (DeSmet i wsp., 2007, Depoortere i wsp., 2008). Nie wykazano jednak wpływu obestatyny ani na apetyt, ani na masę ciała.

Badania zaprzeczające działaniu anoreksygennemu obestatyny są zdecydowanie liczniejsze (Seoane i wsp., 2006, DeSmet i wsp., 2007, Gourcerol i wsp., 2007a, Gourcerol i wsp., 2007b, Holst i wsp., 2007, Nogueiras i wsp., 2007, Depoortere i wsp., 2008). Niektórzy podają wręcz w wątpliwość jakąkolwiek aktywność biologiczną obestatyny i proponują, by odstąpić od nazwy „obestatyna" sugerującej działanie hamujące apetyt (obedere – łac. objadać się, statin – łac. hamować) i zastąpić ją mianem peptydu towarzyszącego ghrelinie (Gourcerol i wsp., 2006, Bang i wsp., 2007, Gourcerol i wsp., 2007b, Gourcerol i Taché 2007c, Soule i wsp., 2007, Depoortere i wsp., 2008).

Dotychczas nie analizowano wpływu obestatyny na apetyt u ludzi. Zaobserwowano jednak, że w otyłości, cukrzycy typu II i zaburzeniach tolerancji glukozy stężenie obestatyny jest niższe niż u osób zdrowych (Guo i wsp., 2007, Huda i wsp., 2007, Qi i wsp., 2007, Zamrazilová i wsp., 2008, Beasley i wsp., 2009, Gao i wsp., 2009). U chorych z anoreksją stwierdzono natomiast wysokie stężenia obestatyny ulegające spadkowi w doustnym teście obciążenia glukozą (Harada i wsp., 2008). Obserwacje te pośrednio mogą sugerować udział obestatyny w mechanizmie regulującym przyjmowanie pokarmu i masę ciała.

Qi i wsp. dodatkowo wykazali negatywną korelację pomiędzy stężeniem obestatyny a obwodem pasa i współczynnikiem insulinooporności (HOMA-IR) u chorych z cukrzycą typu II (Qi i wsp., 2007). Nie można zatem wykluczyć zależności pomiędzy produkcją obestatyny a ilością tłuszczowej masy ciała oraz insulinowrażliwością.

Wpływ obestatyny na czynność komórek β nie został określony. Z jednej strony, Granata i wsp. (2008) odnotowali wzrost wydzielania insuliny pod wpływem obestatyny. Z drugiej strony, zaobserwowano, że komórki β trzustki inkubowane w stałym, wysokim stężeniu glukozy pod wpływem obestatyny wykazywały spadek produkcji insuliny (Qader i wsp., 2007, Ren i wsp., 2008). Podobnie dootrzewnowe i dożylne podanie obestatyny myszom i szczurom podczas karmienia skutkowało łagodniejszym wzrostem glikemii i osłabioną produkcją insuliny (Green i wsp., 2007, Ren i wsp., 2008). Niejako uzupełnieniem tych obserwacji są badania w których zauważono, że czynnikiem decydującym o wpływie obestatyny na produkcję insuliny może być stężenie glukozy (Unniappan i wsp., 2008, Egido i wsp., 2009). Stwierdzono bowiem, że obestatyna wykazuje zdolność zwiększania wydzielania insuliny przy fizjologicznych dawkach glukozy, ale nie przy wysokiej glikemii.

1.9.2 Obestatyna a przewód pokarmowy

Mimo obiecujących wstępnych wyników zaprezentowanych przez Zhanga i wsp. (2005), zdecydowana większość późniejszych badań była zgodna co do braku wpływu obestatyny na opróżnianie żołądka i perystaltykę jelit (Gourcerol i wsp., 2006, Seoane i wsp., 2006, Bassil i wsp., 2007, De Smet i wsp., 2007, Gourcerol i wsp., 2007b, Nogueiras i wsp., 2007, Chen i wsp., 2008, Depoortere i wsp., 2008). Również w badaniach eksperymentalnych po podaniu egzogennej obestatyny do zbiornika móżdżkowo-rdzeniowego (zbiornika wielkiego, łac. cisterna magna), który jest regionem regulującym motorykę żołądka, nie zaobserwowano żadnych zmian (Gourcerol i wsp., 2007a).

1.9.3 Obestatyna a hormon wzrostu

W badaniach polegających na obwodowym (dożylnym, dootrzewnowym) podaniu obestatyny nie wykazano zmian w wydzielaniu GH (Bresciani i wsp., 2006, Nogueiras i wsp., 2007, Samson i wsp., 2007, Yamamoto i wsp., 2007). Pan i wsp. (2006) stwierdzili, że obestatyna nie przekracza bariery krew-mózg, co stanowiłoby wyjaśnienie dla wyników tych prac.

Dotychczas w jednym badaniu przeprowadzonym na hodowli komórek somatotropinowych *in vitro*, zaobserwowano, że obestatyna stymuluje produkcję GH, wskazując na jej działanie auto- lub parakrynowe w tym zakresie (Pazos i wsp., 2009). Z drugiej strony jednak, w badaniach eksperymentalnych na gryzoniach wykazano, że obestatyna podana dożylnie hamuje stymulowane ghreliną wydzielanie GH (Zizzari i wsp., 2007).

1.9.4 Obestatyna a proliferacja komórkowa

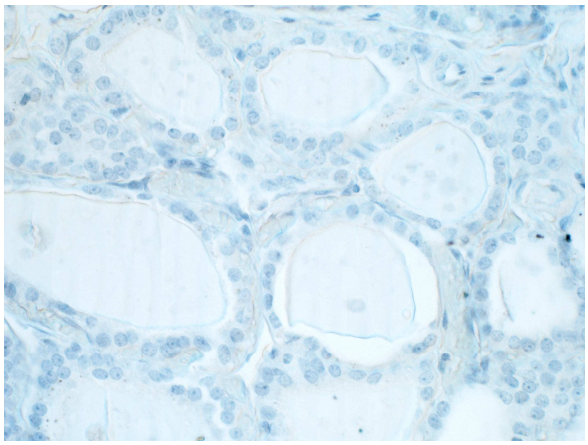
Po raz pierwszy pobudzający wpływ obestatyny na proliferację komórkową zaobserwowano w badaniu na komórkach siatkówki (Camina i wsp., 2007). Do tej pory wykazano proproliferacyjne właściwości obestatyny także stosunku do komórek raka żołądka (Pazos i wsp., 2007), komórek ziarnistych jajnika (Mészárosová i wsp., 2008) oraz pre-adipocytów (Zhang i wsp., 2008). Granata i wsp. (2008) wykazali również, że obestatyna przedłuża żywotność, hamuje apoptozę i stymuluje proliferację, komórek β trzustki.

1.10 Tarczyca a regulacja metabolizmu

1.10.1 Tarczyca – anatomia i fizjologia

Tarczyca jest gruczołem wydzielania wewnętrznego położonym między wcięciem mostka a chrząstką pierścieniowatą, zbudowanym zazwyczaj z dwóch płatów – prawego i lewego połączonych cieśnią. Dodatkowo może występować nieparzysty płat piramidowy odchodzący ku górze od górnego bieguna gruczołu, będący pozostałością przewodu tarczowo-językowego.

Podstawową jednostką czynnościową i strukturalną gruczołu tarczowego są wypełnione koloidem pęcherzyki tarczycowe utworzone przez komórki pęcherzykowe (tyreocyty) (ryc. 6).



Ryc. 6 Pęcherzyki tarczycy wypełnione koloidem. Barwienie hematoksylina i eozyną. Powiększenie obiektywu: 40x.

Hormony tarczycy (HT) produkowane są na swoistym rusztowaniu podstawowego białka koloidu tarczycowego – tyreoglobuliny (Tg). Reszty tyrozynowe, wchodzące w skład cząsteczki Tg ulegają jodowaniu w procesie syntezy HT, stąd warunkiem odpowiedniej produkcji HT jest prawidłowe zaopatrzenie w jod. Głównym stymulatorem produkcji HT jest tyreotropina (TSH) wydzielana przez komórki tyreotropinowe przysadki pod wpływem podwzgórzowej tyreoliberyny (TRH) pozostającej z hormonami tarczycy w układzie sprzężenia zwrotnego ujemnego.

Pierwszym etapem syntezy HT jest ekstrakcja jodków (I^-) z krwi i ich koncentracja w tarczycy. W transporcie jodu przez błonę podstawną tyreocytów uczestniczy białko przezbłonowe zwane symporterem sodowo-jodkowym (NIS), a odpowiedni gradient sodu niezbędny do dostarczenia energii powstaje przy udziale Na^+/K^+ ATP-azy. Jodki utleniane są do jodu atomowego (I^o), który przy udziale białka pendryny zostaje przemieszczony z wnętrza tyreocytów przez błonę szczytową do światła koloidu. Tam, dzięki aktywności enzymu tyreoperoksydazy dochodzi do jodowania reszt tyrozynowych tyreoglobuliny. Powstaje 3-monojodotyrozyna (MIT) i 3,5-dijodotyrozyna (DIT), które następnie ulegają sprzęganiu w 3,5,3',5'-tetrajodotyroninę (tyroksynę, T_4) i 3,5,3 - trójjodotyroninę (T_3). Powstałe hormony tarczycy związane z cząsteczką tyreoglobuliny są następnie odłączane w procesie proteolizy. Synteza tyroksyny

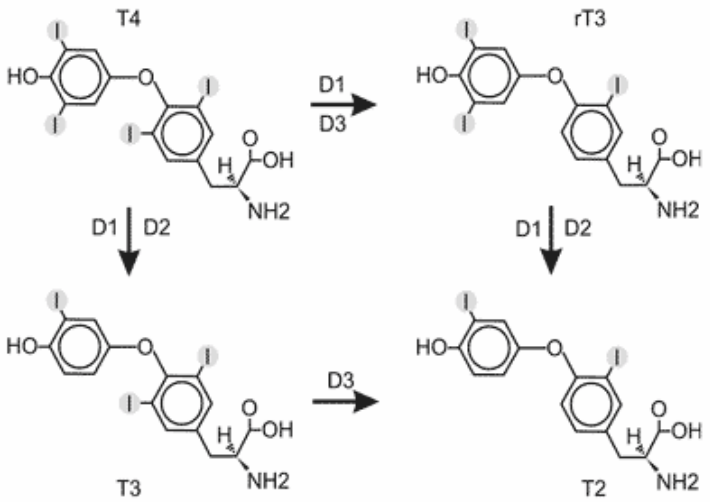
zostaje ukończona w tarczycy. Trójjodotyronina natomiast tylko w ok. 20% powstaje bezpośrednio w tarczycy, a w ok. 80% na skutek dejodynacji tyroksyny w tkankach obwodowych.

W przemianach hormonów tarczycy biorą udział trzy typy enzymów (dejodynaz) – każdy o innej roli i nieco odmiennej lokalizacji tkankowej.

5'-dejodynaza typu 1 (D1) wykazuje ekspresję w wielu narządach, m.in. w wątrobie, nerkach, tarczycy, sercu i mięśniach szkieletowych. Na skutek jej aktywności z tyroksyny (T_4) powstaje trójjodotyronina (T_3) lub nieaktywna 3,3',5'-rewers-trójjodotyronina (rT_3).

5'-dejodynaza typu 2 (D2) występuje w wielu tkankach obwodowych – mięśniach szkieletowych, brunatnej tkance tłuszczowej, a także ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), w tym w przysadce. Katalizuje ona przemianę T_4 do T_3. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa enzymu (retikulum endoplazmatyczne, ER) sprzyja ligacji z jądrowym receptorem T_3. Tkanki wykazujące ekspresję D2 mają zatem dodatkowe źródło T_3 w postaci konwertowanej T_4, a wysycenie receptora hormonów tarczycy w tych komórkach może osiągać 100%.

5-dejodynaza typu 3 (D3) jest enzymem błonowym obecnym głównie w ośrodkowym układzie nerwowym, łożysku i skórze. Aktywuje ona reakcję przemiany T_4 do rT_3 lub T_3 do jej nieaktywnej formy - dijodotyroniny (T_2) (ryc. 7).



Ryc. 7 Przemiany jodotyronin (T_4 - 3,5,3',5'-tetrajodotyronina, tyroksyna, T_3 - 3,5,3 – trójjodotyronina, rT_3- 3,3',5'-rewers-trójjodotyronina, T_2 – dijodotyronina, D1 – dejodynaza 1, D2 – dejodynaza 2, D3 – dejodynaza 3) wg Nauman i wsp. (2008)

Hormony tarczycy dostają się do komórki docelowej poprzez transporter OATP1C1 (organic acid transporter protein 1c1) lub MCT (monocarboxylate transporter-8) i wiążą się z jądrowym receptorem hormonów tarczycy (TR). Powinowactwo trijodotyroniny do tego receptora jest ok. 10-krotnie większe niż tyroksyny.

W wyniku alternatywnej transkrypcji dwóch genów kodujących receptor T_3 powstaje siedem jego izoform: trzy z rodziny TRα - $TR\alpha_1$, $TR\alpha_2$ $TR\alpha_3$ oraz cztery z rodziny TRβ – $TR\beta_1$, $TR\beta_2$, $TR\beta_3$ i $TR\beta_{\Delta 3}$. Podczas gdy trzy izoformy z rodziny TRβ ($TR\beta_1$, $TR\beta_2$, $TR\beta_3$) wiążą T_3, z rodziny TRα aktywna jest tylko $TR\alpha_1$ (Herwig i wsp., 2008).

Izoformy receptora, wykazując zróżnicowaną ekspresję tkankową, odpowiadają za poszczególne elementy aktywności biologicznej hormonów tarczycy. Większość efektów działania przekazywana jest za pośrednictwem izoformy TRβ. Za wpływ hormonów tarczycy na pracę serca odpowiada $TR\alpha_1$.

W gruczole tarczowym oprócz tyreocytów produkujących hormony występują komórki okołopęcherzykowe (komórki parafolikularne, komórki C), które znajdują się w ścianie pęcherzyków pomiędzy tyreocytami lub pomiędzy pęcherzykami. Komórki okołopęcherzykowe pochodzą z neuroektodermy i wchodzą do rozwijającej się tarczycy w czasie, gdy czwarta kieszonka krtaniowa łączy się z nabłonkiem tarczycy. Komórki C należą do rozproszonego układu endokrynnego (dawniej - komórki serii APUD, ang. amine-precursors-uptake-decarboxylation), stąd mogą być zlokalizowane w mniejszej ilości także pozatarczycowo, m.in. w płucach, rdzeniu nadnerczy i przewodzie pokarmowym. Komórki okołopęcherzykowe mają zdolność produkowania kalcytoniny – polipeptydowego hormonu odgrywającego rolę w regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej organizmu.

1.10.2 Regulacja przemiany materii i rola tarczycy

Przemiany metaboliczne zachodzące w poszczególnych komórkach organizmu są konieczne do ich prawidłowego funkcjonowania oraz odpowiedniej adaptacji do zmiennych warunków środowiskowych.

Wyróżnia się dwie podstawowe grupy procesów energetycznych – endoenergetyczne (anaboliczne) i egzoenergetyczne (kataboliczne). Warunkiem zaistnienia reakcji endoenergetycznych jest dostarczenie energii, a ich skutkiem - synteza związków chemicznych. W przebiegu reakcji egzoenergetycznych dochodzi do rozpadu złożonych substancji wyjściowych na produkty prostsze, czemu towarzyszy uwolnienie energii, również w postaci energii cieplnej (termogeneza).

Wpływ hormonów tarczycy na tempo przemian metabolicznych i termogenezę znany jest od ponad wieku. W 1895r. Adolf Magnus-Levy po raz pierwszy wykazał, że w nadczynności tarczycy wzrasta zużycie tlenu i produkcja CO_2, a wyleczenie chorych prowadzi do normalizacji tych parametrów. Wiadomo jednak, że także w warunkach eutyreozy, gdy stężenie hormonów utrzymuje się na względnie stałym poziomie, tarczyca odgrywa znaczącą rolę w regulacji stanu energetycznego organizmu. Liczne badania na przestrzeni lat pozwoliły w znacznym stopniu na zrozumienie tego mechanizmu, choć pewne jego elementy w dalszym ciągu pozostają nieznane.

Hormony tarczycy wykazują szerokie spektrum działania na liczne tkanki organizmu. Wpływają na metabolizm komórek bezpośrednio, ale również poprzez stymulację autonomicznego układu nerwowego dzięki aktywacji receptorów podwzgórzowych ($TR\alpha_1$, $TR\beta_1$ i $TR\beta_2$). Pobudzenie współczulnego układu nerwowego prowadzi do zwiększenia produkcji katecholamin. Katecholaminy z kolei hamują degradację D2 w proteasomach komórkowych, co dodatkowo zwiększa stężenie T_3.

Hormony tarczycy nasilają oksydację wolnych kwasów tłuszczowych, pobudzają glukoneogenezę, glikogenolizę i zwiększają ekspresję GLUT4 (transportera glukozy zależnego od insuliny), co prowadzi do wzrostu stężenia glukozy w osoczu (Klieverik i wsp., 2008).

W zakres działania prometabolicznego hormonów tarczycy wpisuje się także pobudzające działanie na perystaltykę przewodu pokarmowego. Prawdopodobnie związane jest ono z bezpośrednim działaniem T_3, ale także z pośrednim wpływem autonomicznego układu nerwowego (Ebert 2010).

W układzie sercowo-naczyniowym hormony tarczycy uwrażliwiają śródbłonek na działanie układu współczulnego i zwiększają ilość receptorów β-adrenergicznych. Wpływają na układ bodźco-przewodzący, wykazując działanie chrono-, inotropowe dodatnie oraz arytmogenne. Relaksacja mięśniówki gładkiej naczyń i w konsekwencji spadek oporu obwodowego wraz ze zwiększonym rzutem serca u chorych z nadczynnością tarczycy dają zatem obraz krążenia hyperkinetycznego (Klein i Danzi, 2007).

Konwersja T_4 do T_3 nasila przemiany kataboliczne i zwiększa ilość uwalnianej energii. W procesie termogenezy uczestniczą głównie tkanki wykazujące ekspresję D2. Kluczowym narządem biorącym udział w termogenezie adaptacyjnej noworodków jest brunatna tkanka tłuszczowa. U dorosłych rolę tę prawdopodobnie spełniają mięśnie szkieletowe, w których D2 występuje w podobnych ilościach. Hormony tarczycy wpływają na utrzymanie prawidłowej temperatury ciała także poprzez stymulujący wpływ na transkrypcję genów mitochondrialnych białek rozprzęgających UPC (UPC1, UPC2, UPC3) bezpośrednio uczestniczących w procesie termogenezy (Herwig i wsp., 2008).

1.10.3 Zaburzenia funkcji tarczycy

Zaburzenia funkcji tarczycy prowadzą do zachwiania równowagi energetycznej organizmu. Wykazano, że u pacjentów z ciężką niedoczynnością tarczycy całkowity wydatek energetyczny spada o ok. 50%, a u chorych z hypertyreozą może wzrosnąć o 50%, co daje trzykrotną różnicę tempa metabolizmu pomiędzy tymi zaburzeniami (Herwig i wsp., 2008).

W nadczynności tarczycy nadmiar energii częściowo zamieniany jest na ciepło (zwiększona termogeneza) (Sestoft 1980). Wobec nasilenia procesów egzoenergetycznych obserwuje się spadek masy ciała nawet o 15% wartości wyjściowej, co wynika nie tylko z redukcji tkanki tłuszczowej, ale także z zaników mięśniowych (Herwig i wsp., 2008). W związku ze wzrostem zapotrzebowania kalorycznego, u pacjentów z hypertyreozą występuje wzmożony apetyt. W obraz nadczynności tarczycy wpisuje się także

m.in. tachykardia, zaburzenia rytmu serca, duszność, przyspieszenie perystaltyki przewodu pokarmowego, nietolerancja ciepła, nadmierna potliwość, drżenie rąk, nadpobudliwość psychoruchowa.

W niedoczynności tarczycy natomiast dochodzi do spadku tempa przemian metabolicznych, czego konsekwencją jest bradykardia, spowolnienie perystaltyki przewodu pokarmowego, uczucie zimna, osłabienie napędu psychoruchowego, zaburzenia koncentracji i in. Zaobserwowano, że w hypotyreozie stężenie TSH koreluje negatywnie z wydatkiem energetycznym w spoczynku (al-Adsani i wsp., 1997). Przy niezmienionym apetycie u tych chorych dochodzi do przyrostu masy ciała – nawet o 30% wartości wyjściowej (Herwig i wsp., 2008, Klieverik i wsp., 2009).

2 ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Tarczyca odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu równowagi energetycznej organizmu. Zaburzenia stanu metabolicznego wpływają na syntezę i wydzielanie hormonów tarczycy, a z drugiej strony dysfunkcje czynnościowe gruczołu tarczowego (nadczynność lub niedoczynność) prowadzą do zaburzeń przemiany materii.

Udowodniono, że ghrelina jest regulatorem procesów metabolicznych. Obestatyna - peptyd pochodzący z tego samego, co ghrelina prekursora, rozpatrywany jest w kategoriach kolejnego czynnika mogącego oddziaływać na stan energetyczny organizmu. Należy zatem rozważyć ewentualną zależność pomiędzy czynnością tarczycy a wydzielaniem siostrzanych peptydów.

W związku z tym, że we wcześniejszych badaniach ghrelina i obestatyna wykazywały modulujący wpływ na komórki na drodze auto- i parakrynowej, nie można wykluczyć, że peptydy te mogą regulować funkcje gruczołu tarczowego także jako czynniki produkowane lokalnie.

Celem pracy było poznanie roli ghreliny i obestatyny jako potencjalnych modulatorów sekrecji hormonów tarczycy, czemu posłużyła:

1. Analiza stężeń ghreliny i obestatyny w warunkach różnego stopnia wydolności sekrecyjnej tarczycy
    1) W nadczynności tarczycy
    2) W niedoczynności tarczycy w przebiegu zapalenia tarczycy typu Hashimoto
    3) W niedoczynności tarczycy po strumektomii całkowitej z powodu raka tarczycy po 4 tygodniach przerwy w zażywaniu L-tyroksyny
    4) U osób zdrowych (w stadium eutyreozy)

Ponadto badanie obejmowało:

1) Porównanie stężeń ghreliny i obestatyny w osoczu chorych z niedoczynnością tarczycy w przebiegu przewlekłego zapalenia tarczycy przed leczeniem i po uzyskaniu eutyreozy
2) Porównanie stężeń ghreliny i obestatyny w osoczu chorych z nadczynnością tarczycy przed leczeniem i po uzyskaniu eutyreozy
3) Porównanie stężeń ghreliny i obestatyny w osoczu chorych z nadczynnością tarczycy leczonych radiojodem (1) w momencie rozpoznania choroby, (2) w stadium niedoczynności tarczycy po leczeniu izotopowym i (3) po uzyskaniu eutyreozy w wyniku leczenia preparatami L-tyroksyny

2. Analiza ekspresji ghreliny i obestatyny w (1) w zdrowej tarczycy, (2) nowotworach łagodnych i (3) nowotworach złośliwych tarczycy.

3 MATERIAŁY I METODY

3.1 Analiza stężeń ghreliny i obestatyny w osoczu

3.1.1 Grupa badana

Grupa badana składała się z 57 chorych z zaburzeniami czynności tarczycy hospitalizowanych w Klinice Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz leczonych w przyklinicznej Poradni Endokrynologicznej. Badania prowadzono od listopada 2008r. do września 2010r. Spośród wszystkich uczestników badania wyodrębniono chorych z nadczynnością tarczycy i niedoczynnością tarczycy.

3.1.1.1 Nadczynność tarczycy

Do grupy chorych z nadczynnością tarczycy zakwalifikowano 23 pacjentów ze świeżo rozpoznaną, dotychczas nie leczoną nadczynnością tarczycy (19 chorych z chorobą Graves-Basedowa - 16 kobiet i trzech mężczyzn oraz 4 chorych z wolem guzowatym nadczynnym - trzy kobiety i jednego mężczyznę).

Stężenie ghreliny i obestatyny w osoczu oznaczono ponownie po klinicznym i biochemicznym wyrównaniu czynności tarczycy. W trakcie prowadzenia badań eutyreozę uzyskało 15 pacjentów.

Chorzy z nadczynnością tarczycy leczeni radiojodem po 6 tygodniach od podania ^{131}I zgłaszali się do Poradni Endokrynologicznej na badania kontrolne. W przypadku stwierdzenia klinicznych i biochemicznych wykładników poterapeutycznej niedoczynności tarczycy po raz kolejny oznaczano stężenie ghreliny i obestatyny w osoczu. Następnie włączano leczenie L-tyroksyną i po wyrównaniu stanu czynnościowego tarczycy ponownie wykonywano badanie. Powyższy przebieg choroby zaobserwowano u 7 pacjentów (6 kobiet i jednego mężczyzny).

3.1.1.2 Niedoczynność tarczycy

Do podgrupy chorych z niedoczynnością tarczycy zakwalifikowano 19 pacjentów po strumektomii całkowitej z powodu raka tarczycy (16 kobiet i trzech mężczyzn) oraz 15 pacjentów z hypotyreozą w przebiegu zapalenia tarczycy typu Hashimoto (12 kobiet i trzech mężczyzn).

Niedoczynność tarczycy po strumektomii całkowitej

Badanie chorych z niedoczynnością tarczycy po strumektomii całkowitej z powodu raka tarczycy zostało przeprowadzone podczas planowej kontrolnej hospitalizacji w Klinice Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych. Chorzy zostali przyjęci do szpitala po 4 tygodniach przerwy w zażywaniu L-tyroksyny.

Diagnostyka w warunkach endogennej stymulacji TSH ma na celu zwiększenie jodochwytności tarczycy i jest rutynowym postępowaniem podczas kwalifikacji do leczenia radiojodem.

Niedoczynność tarczycy w przebiegu zapalenia tarczycy typu Hashimoto

Pogdrupę chorych ze świeżo rozpoznaną niedoczynnością tarczycy w przebiegu przewlekłego zapalenia tarczycy stanowili pacjenci przyklinicznej Poradni Endokrynologicznej.

U chorych z hypotyreozą w przebiegu przewlekłego zapalenia tarczycy stężenie ghreliny i obestatyny w osoczu oznaczono ponownie po wyrównaniu czynności tarczycy w wyniku leczenia L-tyroksyną. W czasie trwania badań eutyreozę uzyskało 10 pacjentów.

3.1.2 Grupa kontrola

Uzyskane wyniki porównano z grupą kontrolną, którą stanowiło 26 zdrowych ochotników (23 kobiety i trzech mężczyzn) zgodnych pod względem płci, wieku oraz wskaźnika masy ciała (BMI) z grupą badaną.

Wzór informacji dla osób biorących udział w badaniu oraz wzór zgody uczestnictwa zostały zamieszczone na stronie 124 i 125.

3.1.3 Metodyka badań

3.1.3.1 Diagnostyka zaburzeń czynności tarczycy

Badanie podmiotowe i przedmiotowe przeprowadzono celem oceny stanu klinicznego osób uczestniczących w badaniu i weryfikacji ewentualnych pozatarczycowych zaburzeń mogących wpływać na stężenie ghreliny i obestatyny w osoczu. Chorzy, u których stwierdzono otyłość, niedowagę, cukrzycę, niewydolność wątroby, niewydolność nerek, niewydolność krążenia, zmiany zapalne żołądka i jelit czy kacheksję w przebiegu chorób przewlekłych nie zostali zakwalifikowani do dalszego etapu badań.

Stan czynnościowy tarczycy określano poprzez oznaczenie w osoczu krwi stężeń tyreotropiny (TSH), wolnej trójjodotyroniny (fT_3) i wolnej tyroksyny (fT_4). Badania wykonano metodą elektrochemiluminescencyjną przy użyciu aparatu COBAS e 601 firmy Hitachi. Nadczynność tarczycy rozpoznawano na podstawie podwyższonego stężenia wolnych hormonów tarczycy przy obniżonym stężeniu TSH. Niedoczynność tarczycy rozpoznawano u chorych z obniżonym stężeniem wolnych hormonów tarczycy i podwyższonym stężeniem TSH.

Celem oceny zaburzeń immunologicznych w osoczu krwi osób badanych oznaczono stężenie przeciwciał przeciwtarczycowych – przeciwciał przeciwko receptorowi TSH (TRAb), przeciwko tyreoperoksydazie (aTPO) i przeciwko tyreoglobulinie (aTg). Badania wykonano metodą radioimmunologiczną przy użyciu zestawu komercyjnego (Brahms Diagnostica, Berlin, Germany).

Badania obrazowe tarczycy wykonano przy pomocy aparatu ultrasonograficznego ALOKA SSD 3500SV z głowicą o zmiennej częstotliwości 7,5 – 14MHz. W przypadku stwierdzenia zmian guzkowych tarczycy i wskazań do badania cytologicznego, za zgodą pacjenta wykonywano biopsję aspiracyjną cienkoigłową.

U pacjentów z niedoczynnością tarczycy po strumektomii całkowitej z powodu raka tarczycy dodatkowo oznaczano stężenie tyreoglobuliny Tg (metoda radioimmunologiczna, zestaw Brahms Diagnostica, Berlin, Germany)

i wykonywano scyntygrafię całego ciała z użyciem izotopu ^{131}I celem potwierdzenia nieobecności tkanki tarczycy. Radioaktywność próbek oceniano w liczniku promieniowania γ (γ LKB-Wallac CliniGamma 1272).

3.1.3.2 Oznaczenie stężeń ghreliny i obestatyny w osoczu

Krew do oznaczenia stężeń ghreliny i obestatyny pobierano rano, na czczo (po 10 godzinach bez posiłku i płynu kalorycznego) w ilości 7 ml z żyły łokciowej do probówki zawierającej inhibitory proteaz osoczowych (aprotyninę i kwas etylenodiaminotetraoctowy - EDTA). Krew do oznaczeń pobierano do naczynia z łaźnia lodową i odwirowywano w chłodzonej wirówce.

Oznaczenie stężenia ghreliny w osoczu

Po odwirowaniu osocza w chłodzonej wirówce próbki zostały przechowane w temperaturze -70^{o}C do czasu oznaczeń radioimmunologicznych. Stężenie ghreliny zostało oznaczone w duplikacie metodą radioimmunologiczną przy użyciu zestawu komercyjnego zawierającego przeciwciała poliklonalne służącego do oznaczania stężenia ghreliny całkowitej (Phoenix Pharmaceuticals Inc., nr katalogowy RK-031-30).

Oznaczenie stężenia obestatyny w ekstraktach osocza

Stężenie obestatyny oznaczano w ekstraktach osocza. Osocze krwi po pobraniu i odwirowaniu zakwaszono tą samą ilością 1% kwasu trifluorooctowego (TFA). Następnie ponownie odwirowywano przez 20 minut w chłodzonej ultrawirówce (Beckman) przy obrotach 10 000xg (18000 rpm), a ewentualny osad usuwano. Minikolumny do badań zawierające 200 mg krzemionki C-18 przygotowano przesączaniem 3 ml 60% roztworu acetonitrylu (ACN) w 1% TFA i płukano 10 ml 1% TFA. Zakwaszone osocze przeniesiono na minikolumny. Następnie kolumny płukano 10 ml 1% TFA (1:1). Zatrzymaną na kolumnie obestatynę bardzo wolno (10 kropli na minutę) wypłukiwano 3 ml 60% roztworu ACN w 1% TFA, po czym liofilizowano do suchości w liofilizatorze. Ekstrakt przechowywano w -70 ^{o}C do czasu oznaczeń radioimmunologicznych.

Przed oznaczeniem osad rozpuszczano w 0,3 ml buforu radioimmunologicznego. Do każdej probówki dodawano 100 µl roztworu.

Stężenie obestatyny w ekstrakcie osocza zostało oznaczone w duplikacie metodą radioimmunologiczną przy użyciu zestawu komercyjnego (Phoenix Pharmaceuticals Inc., nr katalogowy RK-031-92). Radioaktywność próbek mierzono w liczniku promieniowania γ (γ LKB-Wallac CliniGamma 1272).

Powyższe badania biochemiczne zostały wykonane w laboratorium Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Badanie ultrasonograficzne tarczycy przeprowadzono w Pracowni Ultrasonografii i Biopsji Narządów Wydzielania Wewnętrznego, a badanie scyntygrafii całego ciała przeprowadzono w Pracowni Medycyny Nuklearnej Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

3.2 Tkankowa ekspresja ghreliny i obestatyny w tarczycy

3.2.1 Materiał

Badane tkanki pochodziły z fragmentów materiału operacyjnego udostępnionego przez dr n. med. Macieja Biczysko i dr n. med. Bolesława Stawnego z Kliniki Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Endokrynologicznej Szpitala Klinicznego im. Heliodora Święcickiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz przez dr n. med. Jacka Lisa z Oddziału Chirurgii Ogólnej i Urazów Wielonarządowych z Pododdziałem Chirurgii Gastroenterologicznej i Endokrynologicznej Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu. Fragmenty tarczyc ludzkich pobrano w trakcie zabiegów operacyjnych przeprowadzonych ze wskazań terapeutycznych.

Materiał tkankowy raka rdzeniastego tarczycy pochodził z archiwum Katedry i Zakładu Anatomii Patologicznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu udostępnionego przez prof. dr. hab. Wiesławę Biczysko i prof. dr. hab. Przemysława Majewskiego.

Analizie poddano 7 przypadków wola guzowatego, 4 przypadki raka brodawkowatego, 10 przypadków raka rdzeniastego i jeden przypadek raka

mieszanego o cechach raka rdzeniastego i pęcherzykowego. Wyniki zostały porównane z badaniem 4 przypadków zdrowej tkanki pobranej z tarczycy operowanej z powodu podejrzenia nowotworu złośliwego zlokalizowanego w przeciwległym płacie.

Kontrolę pozytywną stanowił fragment błony śluzowej żołądka pobrany po gastrektomii przeprowadzonej ze wskazań terapeutycznych.

3.2.2 Metodyka badań immunohistochemicznych

Fragmenty tkanek pobrane w trakcie operacji zostały utrwalone w płynie Bouine'a, odwodnione i zatopione w parafinie. Środkiem utrwalającym w przypadku raka rdzeniastego tarczycy była buforowana formalina. Skrawki tkankowe grubości 5 μm umieszczono na szkiełkach SuperFrost/Plus.

Do oceny ekspresji ghreliny i obestatyny w tarczycy zastosowano klasyczną technikę ABC opartą na tworzeniu kompleksu awidyna - biotynylowana peroksydaza (ang. avidin - biotyn - peroxidase complex) wg Hsu i wsp. (1981). Pierwszym etapem badania było odparafinowanie i nawodnienie preparatów w ksylenie i szeregu alkoholi o malejącym stężeniu. Aktywność endogennej peroksydazy zablokowano za pomocą 1% H_2O_2, po czym preparaty inkubowano w normalnej surowicy koziej o rozcieńczeniu 1:20 (DAKO) celem zablokowania niespecyficznego wiązania. Następnie preparaty inkubowano ze swoistym przeciwciałem przez ok. 18 godzin w temperaturze 4^{o}C. Jako przeciwciał swoistych użyto króliczych przeciwciał antyghrelinowych w rozcieńczeniu 1:7000 (Phoenix Pharmaceuticals, numer katalogowy H-031-30) oraz przeciwciał antyobestatynowych w rozcieńczeniu 1:10 000 (Phoenix Pharmaceuticals, numer katalogowy H-031-92). Celem obiektywizacji uzyskanych wyników w przypadku niektórych preparatów badanie powtórzono z użyciem króliczych przeciwciał przeciwobestatynowych udostępnionych przez prof. dr hab. Jerzego Kosowicza.

Kolejny etap badania obejmował zastosowanie polimeru koniugowanego z peroksydazą (DAKO REAL^{TM} EnVision^{TM}/HRP Rabbit/Mouse) związanego z przeciwciałami skierowanymi przeciwko immunoglobulinom mysim

i króliczym. Jako chromogen zastosowano tetrachlorowodorek 3,3'diaminobenzydyny (DAKO REAL™ DAB+). Preparaty podbarwiano hematoksyliną. Po kolejnych płukaniach preparaty odwadniano w szeregu alkoholi o wzrastających stężeniach i ksylenie, a następnie zamykano przy użyciu balsamu kanadyjskiego i szkiełek nakrywkowych.

Kontrolę negatywną reakcji immunohistochemicznej uzyskano poprzez ominięcie reakcji ze swoistym przeciwciałem. Kontrolę pozytywną reakcji stanowił odczyn immunohistochemiczny ghreliny i obestatyny w błonie śluzowej żołądka.

Badania immunohistochemiczne przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

3.3 Metody statystyczne

Do porównania stężeń ghreliny i obestatyny w poszczególnych grupach zastosowano test Kruskala-Wallisa. Zmiany w stężeniu peptydów u chorych z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto przed i po leczeniu oceniono przy pomocy testu kolejności par Wilcoxona, a u chorych z nadczynnością tarczycy przy pomocy testu t-studenta dla prób powiązanych. W przypadku pojedynczych braków oznaczeń obestatyny wynikających z wady zestawu RIA posłużono się metodą wielokrotnego przyporządkowania.

Na wykonanie powyższych badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Badania sfinansowano z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego NN 402 366638.

Udostępnione przez prof. dr hab. Jerzego Kosowicza przeciwciała przeciwobestatynowe pochodziły z badań finansowanych z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego NN 402 2441 33.

4 WYNIKI

4.1 Analiza stężeń ghreliny i obestatyny w osoczu

Charakterystykę kliniczną i biochemiczną grupy badanej i grupy kontrolnej z uwzględnieniem czynności tarczycy oraz aktywności procesu autoimmunologicznego wraz z wartościami stężeń ghreliny i obestatyny (średnia ± SD) uzyskanych w poszczególnych grupach zamieszczono w tabeli 2.

Tab. 2 Charakterystyka kliniczna i biochemiczna grupy badanej oraz grupy kontrolnej (średnia ± SD) (nb – nie badano).

	Nadczynność tarczycy	**Niedoczynność tarczycy w zapaleniu typu Hashimoto**	**Niedoczynność tarczycy po strumektomii**	**Grupa kontrolna**
Liczebność grupy	23	15	19	26
Płeć (K/M)	19/4	12/3	16/3	23/3
Wiek (lata)	41 ± 14	45 ± 14	43 ± 12	36 ± 10
BMI (kg/m^2)	22,3 ± 3,8	24,7 ± 2,9	25,5 ± 2,9	23,2 ± 2,8
TSH (uIU/ml)	0,005 ± 0,001	90,9 ± 14,1	66,8 ± 24,3	1,9 ± 0,7
fT_4 (pmol/l)	40,8 ± 18,7	2,16 ± 1,1	2,1 ± 0,9	15,8 ± 1,4
fT_3 (pmol/l)	17,1 ± 8,5	1,1 ± 0,5	1,1 ± 0,5	4,7 ± 0,7
aTg (IU/ml)	174,3 ± 279,5	506,3 ± 784,5	15,8 ± 4,1	18,8 ± 11,9
aTPO (IU/ml)	1316,2 ± 1291,3	2320,7 ± 1084,8	Nb	40,4 ± 17,5
chorzy TRAb „+”	19	0	Nb	0
Tg (ng/ml)	nb	nb	0,8 ± 0,8	Nb
ghrelina (pg/ml)	**218,8 ± 86,2**	**740,1 ± 420,4**	**499,2 ± 322,3**	**323,8 ± 124,7**
obestatyna (pg/ml)	**72,3 ± 30,8**	**83,4 ± 39,2**	**94,6 ± 21,3**	**64,1 ± 28,1**

Najczęstszymi objawami zgłaszanymi przez chorych z nadczynnością tarczycy było uczucie niemiarowości serca, wzmożony apetyt, spadek masy ciała, nadpobudliwość nerwowa, nietolerancja ciepła i nadmierna potliwość.

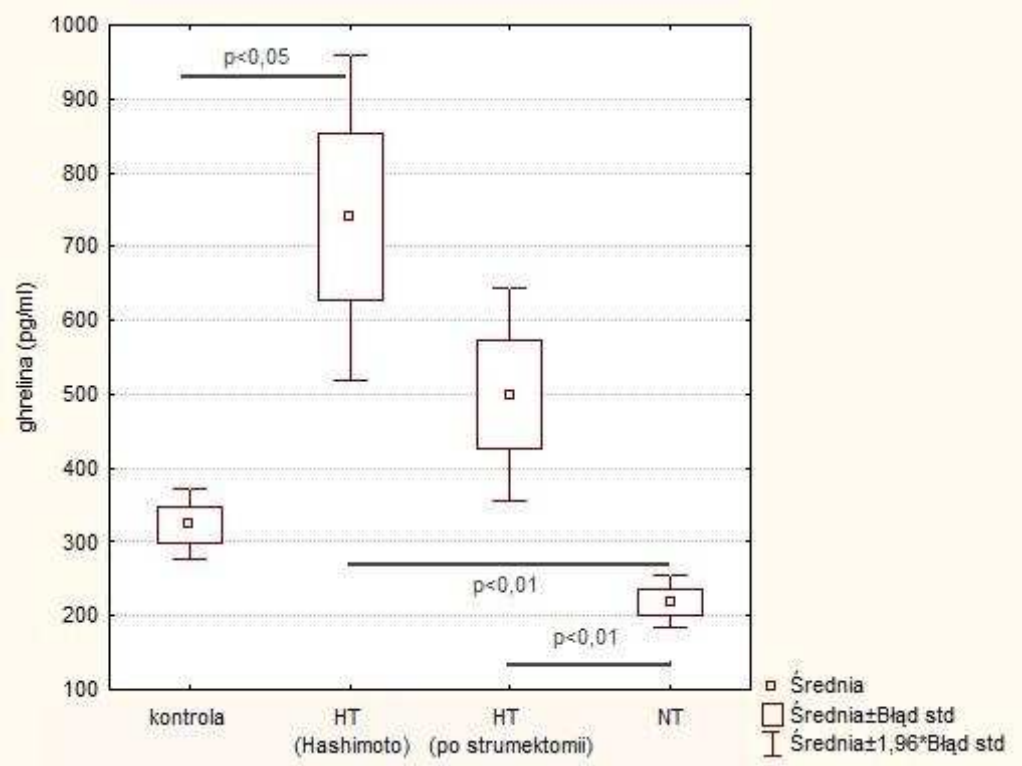
U chorych po strumektomii całkowitej z powodu raka tarczycy z uwagi na krótki okres odstawienia preparatów L-tyroksyny objawy hypotyreozy były miernie nasilone. Pacjenci podawali głównie uczucie zimna, zaparcia, senność.

Chorzy z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto zgłaszali uczucie zmęczenia, osłabienie, zaburzenia koncentracji, przyrost masy ciała i zaparcia. W badaniu przedmiotowym zwracała uwagę sucha, szorstka skóra, obrzęki, głównie w okolicy oczodołowej.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że w niedoczynności tarczycy w przebiegu zapalenia tarczycy typu Hashimoto stężenie ghreliny jest wyższe niż u osób zdrowych (740,1 ± 420,4 pg/ml *vs.* 323,8 ± 124,7 pg/ml, p=0,02) (ryc. 8). Nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w stężeniu ghreliny u chorych z niedoczynnością tarczycy po strumektomii (499,2 ± 322,3 pg/ml *vs.* 323,8 ± 124,7 pg/ml, p=0,99), podobnie u chorych z nadczynnością tarczycy (218,8 ± 86,2 pg/ml *vs.* 323,8 ± 124,7 pg/ml, p=0,15).

Największą różnicę w stężeniu ghreliny stwierdzono pomiędzy niedoczynnością tarczycy u chorych z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto a nadczynnością tarczycy (740,1 ± 420,4 pg/ml *vs.* 218,8 ± 86,2 pg/ml, p<0,01). Stężenie ghreliny u chorych niedoczynnością tarczycy po strumektomii było również istotnie wyższe niż u chorych z hypertyreozą (499,2 ± 322,3 pg/ml *vs.* 218,8 ± 86,2 pg/ml, p<0,01) (ryc.8).

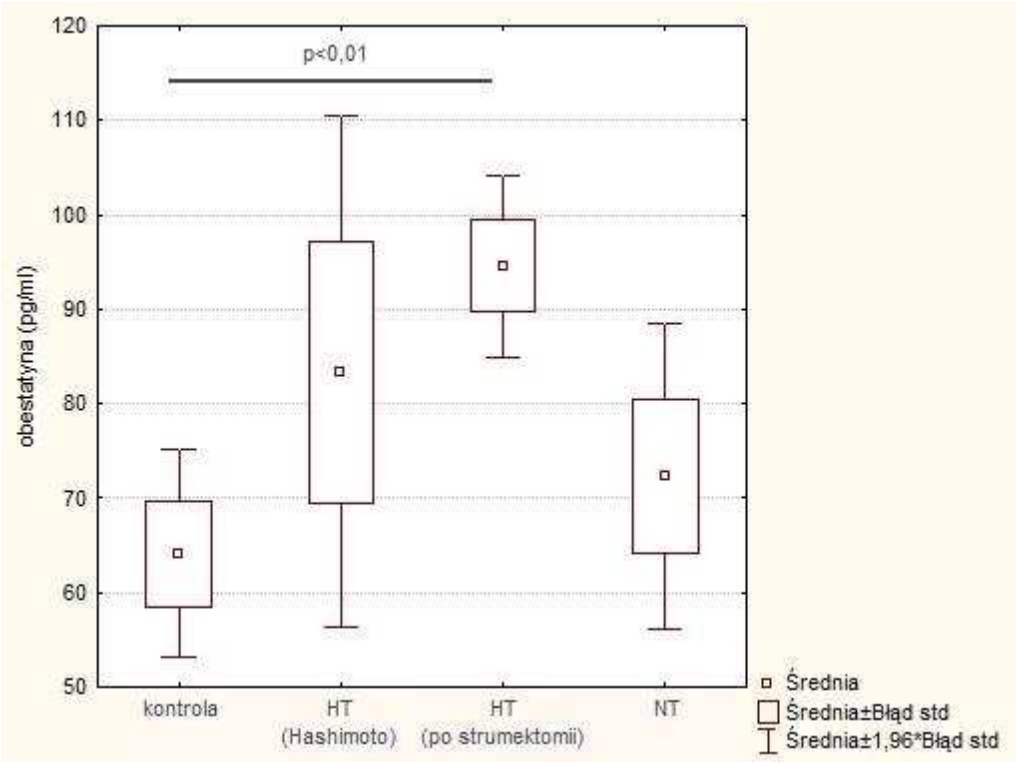
Analiza regresji wykazała, że istotny wpływ na zmienność stężenia ghreliny wykazywały TSH (p<0,01) oraz BMI osób badanych (p<0,05). Ponadto, zaobserwowano, że pozytywna zależność pomiędzy stężeniem ghreliny a stężeniem TSH chorych była bliska istotności statystycznej (p=0,07). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężenim ghreliny a stężeniem wolnych hormonów tarczycy (fT_3, fT_4), ani stężeniem przeciwciał przeciwtarczycowych (TRAb, aTPO, aTg).



Ryc. 8 Stężenie ghreliny w osoczu w poszczególnych stanach czynnościowych tarczycy: w eutyreozie (kontrola), w niedoczynności tarczycy w przebiegu zapalenia tarczycy typu Hashimoto (HT Hashimoto), w niedoczynność tarczycy po strumektomii całkowitej (HT po strumektomii) oraz w nadczynności tarczycy (NT).

Analiza stężeń obestatyny nie wykazała różnic pomiędzy grupą kontrolną a nadczynnością tarczycy (64,1 ± 28,1 pg/ml *vs.* 72,3 ± 30,8 pg/ml, p=1), ani pomiędzy grupą kontrolną a niedoczynnością tarczycy w przewlekłym zapaleniu tarczycy (64,1 ± 28,1 pg/ml *vs.* 83,4 ± 39,2 pg/ml, p=0,7). Natomiast stężenie obestatyny w niedoczynności tarczycy po strumektomii całkowitej było istotnie wyższe od stężenia obestatyny u osób zdrowych (94,6 ± 21,3 pg/ml *vs.* 64,1 ± 28,1 pg/ml, p<0,01) (ryc.9).

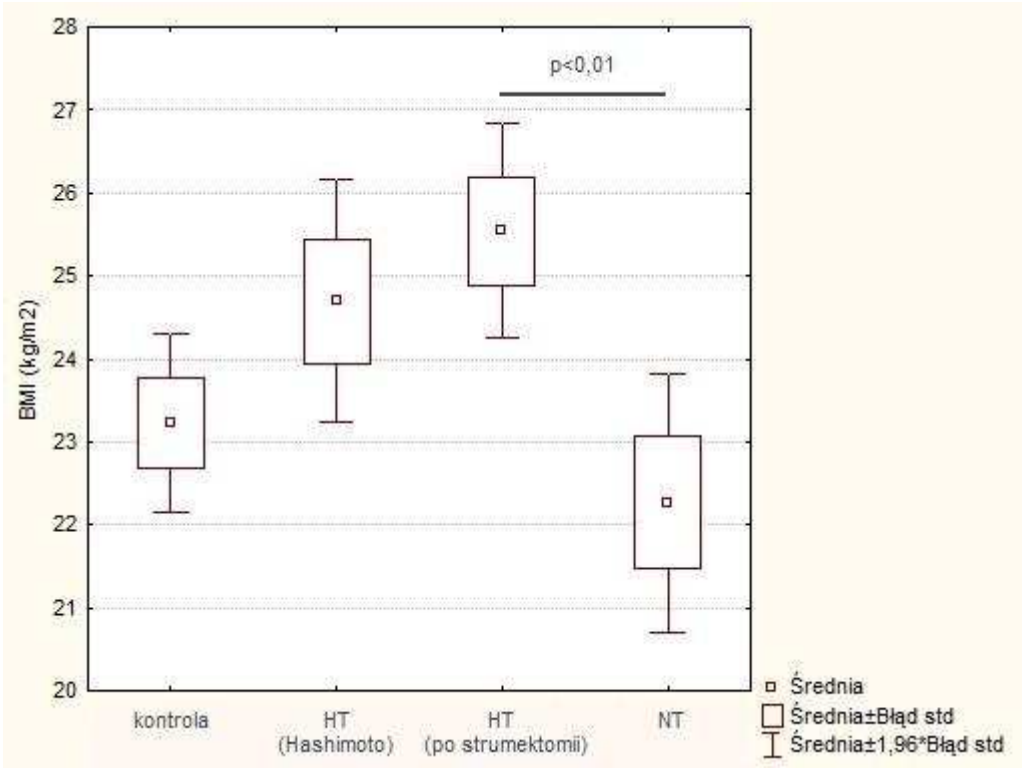
Nie stwierdzono zależności pomiędzy stężeniem obestatyny a wykładnikami czynności tarczycy (TSH, fT_3, fT_4) oraz stężeniem przeciwciał przeciwtarczycowych.



Ryc. 9 Stężenie obestatyny w osoczu w poszczególnych stanach czynnościowych tarczycy: w eutyreozie (kontrola), w niedoczynności tarczycy w przebiegu zapalenia tarczycy typu Hashimoto (HT Hashimoto), w niedoczynności tarczycy po strumektomii całkowitej (HT po strumektomii) oraz w nadczynności tarczycy (NT).

Całościowa analiza grupy kontrolnej i grupy badanej wykazała pozytywną korelację pomiędzy stężeniem ghreliny a stężeniem obestatyny w osoczu ($p<0,01$).

Grupy chorych z nadczynnością tarczycy oraz niedoczynnością tarczycy po strumektomii jako jedyne istotnie różniły się pod względem BMI (22,3 ± 3,8 kg/m^2, mediana 20,2 kg/m^2 *vs.* 25,5 ± 2,9 kg/m^2, mediana 25,9 kg/m^2, $p<0,01$) (ryc. 10).

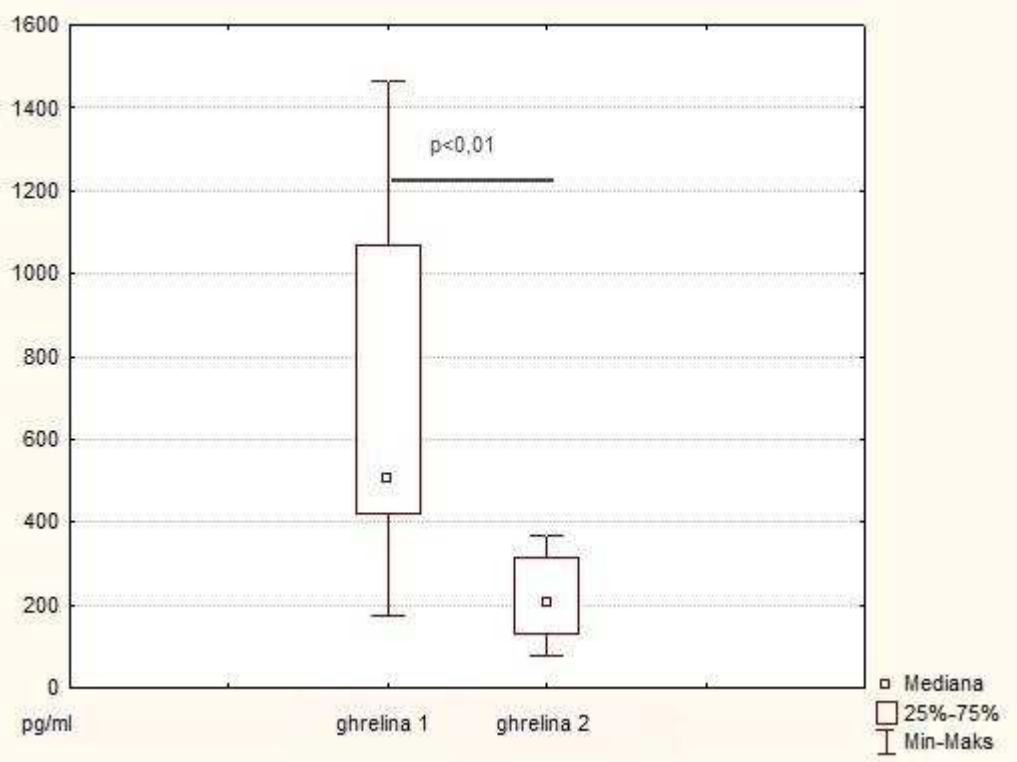


Ryc. 10 Wskaźnik masy ciała (BMI) w grupie kontrolnej, w grupie chorych z niedoczynnością tarczycy w przebiegu zapalenia tarczycy typu Hashimoto (HT Hashimoto), z niedoczynnością tarczycy po strumektomii całkowitej (HT po strumektomii) oraz u chorych z nadczynnością tarczycy (NT).

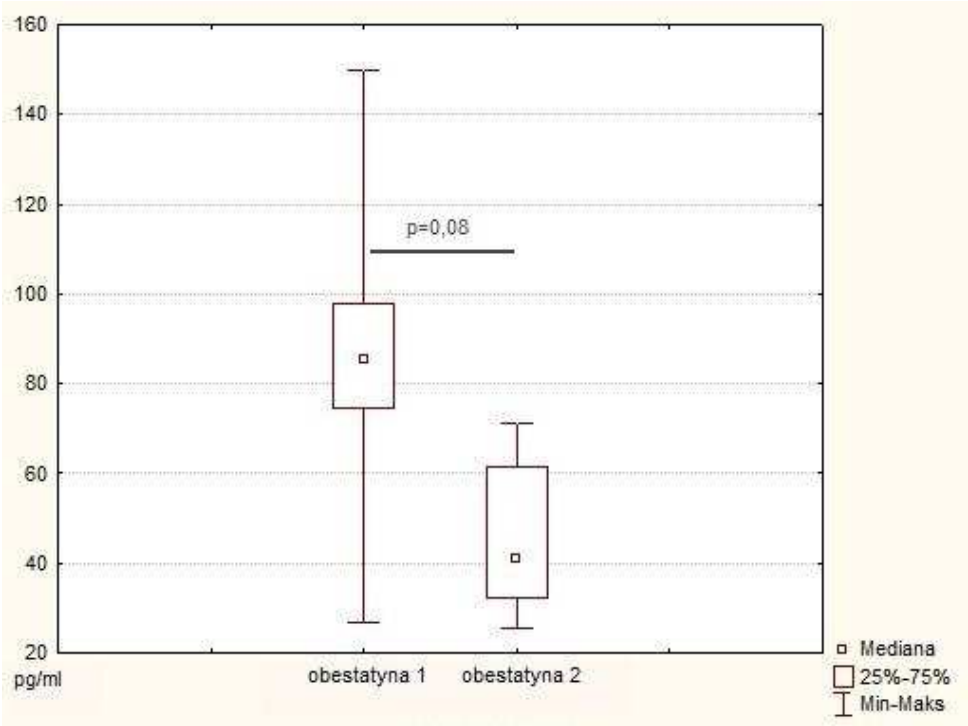
U chorych z hypotyreozą w przebiegu zapalenia typu Hashimoto, u których stężenie ghreliny i obestatyny oceniano ponownie po uzyskaniu eutyreozy zaobserwowano znaczący spadek stężenia ghreliny (704,4 ± 455,8 pg/ml, mediana 505 pg/ml *vs.* 222 ± 109,5 pg/ml, mediana 203,2 pg/ml, p <0,01) (tab. 3, ryc. 11). Obniżenie stężenia obestatyny po leczeniu było bliskie istotności statystycznej (87 ± 44,3 pg/ml, mediana 85,5 pg/ml *vs.* 45,9 ± 16,6 pg/ml, mediana 40,9 pg/ml, p=0,08) (ryc. 12). Wyrównaniu czynności tarczycy towarzyszył spadek BMI chorych (p<0,05) (ryc. 13).

Tab. 3 Charakterystyka biochemiczna grupy 10 chorych z niedoczynnością tarczycy przed i po leczeniu

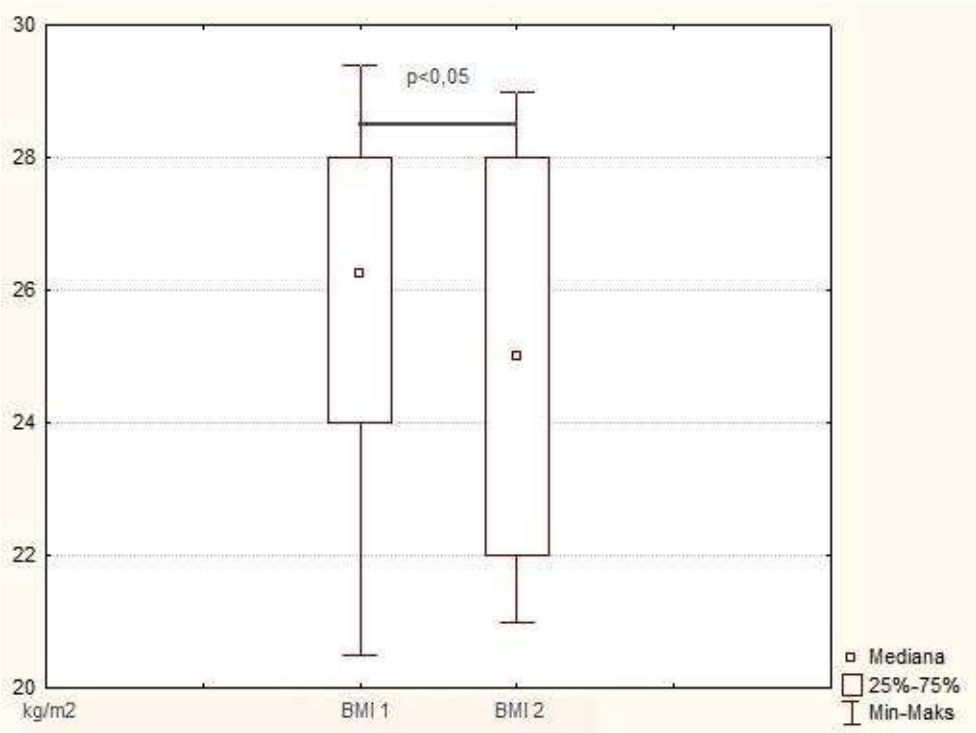
Niedoczynność tarczycy		
	przed leczeniem	**po leczeniu**
TSH (uIU/ml)	92,8 ± 13,5	1,7 ± 1,3
fT_4 (pmol/l)	2,1 ± 1,3	21,1 ± 1,6
fT_3 (pmol/l)	1,1 ± 0,6	5,3 ± 1,2
BMI (kg/m^2)	25,8 ± 2,8	25 ± 3
ghrelina (pg/ml)	**704,4 ± 455,8**	**222 ± 109,5**
obestatyna (pg/ml)	**87 ± 44,3**	**45,9 ± 16,6**



Ryc. 11 Stężenie ghreliny w osoczu chorych z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto w stadium niedoczynności tarczycy (ghrelina 1) oraz w stadium eutyreozy po leczeniu L-tyroksyną (ghrelina 2).



Ryc. 12 Stężenie obestatyny w osoczu chorych z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto w stadium niedoczynności tarczycy (obestatyna 1) oraz w stadium eutyreozy po leczeniu L-tyroksyną (obestatyna 2).

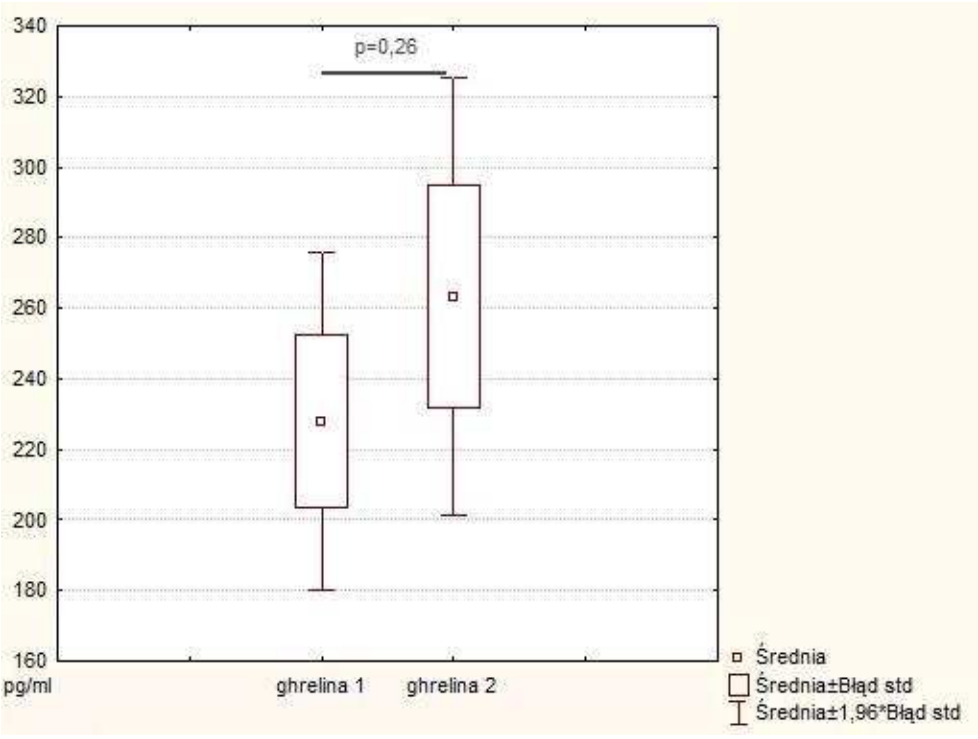


Ryc. 13 BMI chorych z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto w stadium niedoczynności tarczycy (BMI 1) oraz w stadium eutyreozy po leczeniu L-tyroksyną (BMI 2).

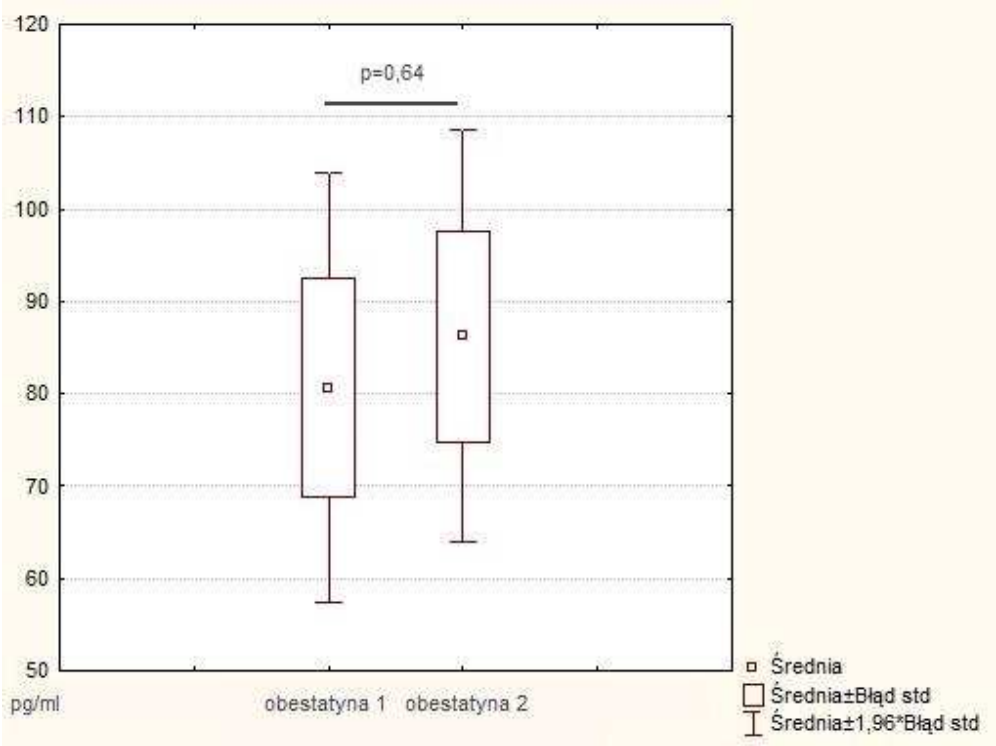
U chorych z nadczynnością tarczycy nie stwierdzono różnic pomiędzy stężeniem ghreliny przed leczeniem i po leczeniu (227,9 ± 94,7 pg/ml *vs.* 263,2 ± 122,4 pg/ml, p=0,26) (tab. 4, ryc. 14). Stężenie obestatyny również nie uległo zmianie (80,7 ± 35,6 pg/ml *vs.* 86,2 ± 34,1 pg/ml, p=0,64) (ryc. 15). Po wyrównaniu czynności tarczycy zaobserwowano wzrost BMI chorych (p<0,01) (ryc. 16).

Tab. 4 Charakterystyka biochemiczna 15 chorych z nadczynnością tarczycy przed i po leczeniu

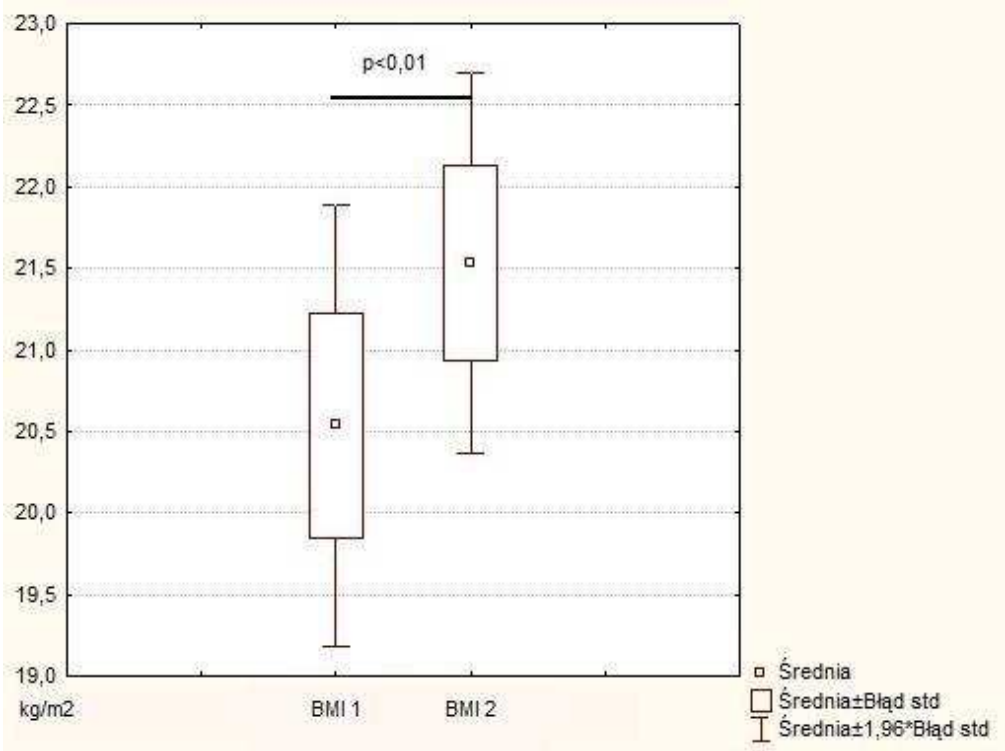
Nadczynność tarczycy		
	przed leczeniem	**po leczeniu**
TSH (uIU/ml)	0,005 ± 0,001	1,7 ± 1,3
fT_4 (pmol/l)	43,3 ± 21,4	17,6 ± 3,3
fT_3 (pmol/l)	18,1 ± 9,7	4,9 ± 0,9
BMI (kg/m^2)	20,5 ± 2,7	21,5 ± 2,3
ghrelina (pg/ml)	**227,9 ± 94,7**	**263,2 ± 122,4**
obestatyna (pg/ml)	**80,7 ± 35,6**	**86,2 ± 34,1**



Ryc. 14 Stężenie ghreliny w osoczu chorych z nadczynnością tarczycy przed leczeniem (ghrelina 1) i po leczeniu (ghrelina 2).



Ryc. 15 Stężenie obestatyny w osoczu chorych z nadczynnością tarczycy przed leczeniem (obestatyna 1) i po leczeniu (obestatyna 2).



Ryc. 16 BMI chorych z nadczynnością tarczycy przed leczeniem (BMI 1) oraz po leczeniu (BMI 2).

Badanie chorych z nadczynnością tarczycy leczonych radiojodem przeprowadzone (1) w momencie rozpoznania, (2) w stadium niedoczynności tarczycy po podaniu ^{131}I oraz (3) po wyrównaniu czynności tarczycy wykazało niskie stężenie ghreliny w stadium nadczynności tarczycy, wzrost stężenia ghreliny w hypotyreozie oraz wartość pośrednią stężenia ghreliny w stadium eutyreozy. Ze względu na małą liczebność grupy (7 chorych) wykazanie istotności statystycznej tych wyników nie było możliwe.

W trakcie oznaczania stężeń obestatyny w 6 przypadkach badanie było niemiarodajne ze względu na wadliwy zestaw RIA wykazujący wiązanie obestatyny 0%. Uzyskane stężenia obestatyny zamieszczono w tabeli 5.

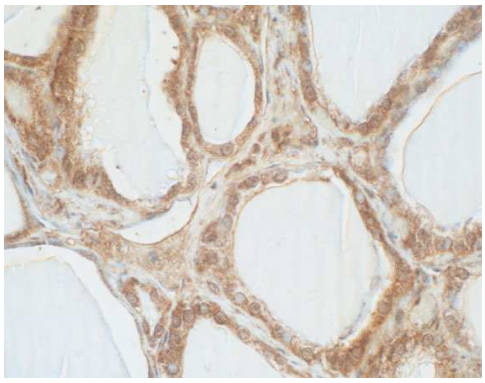
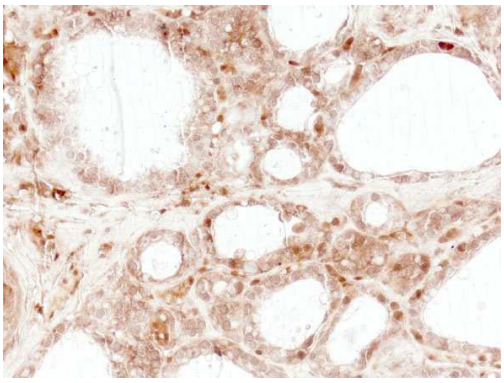
Tab. 5 Charakterystyka biochemiczna 7 pacjentów z nadczynnością tarczycy leczonych radiojodem badanych w trzech stanach czynnościowych tarczycy: w nadczynności tarczycy przed leczeniem, w niedoczynności tarczycy po podaniu jodu promieniotwórczego i po wyrównaniu czynności tarczycy (x – błąd zestawu RIA)

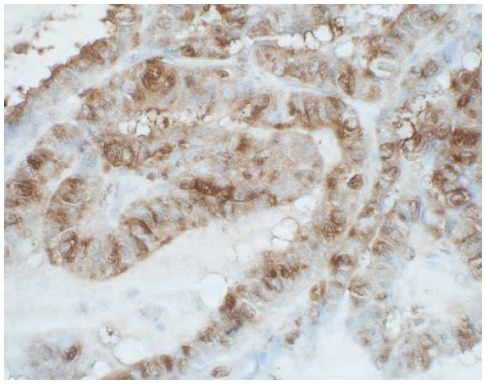
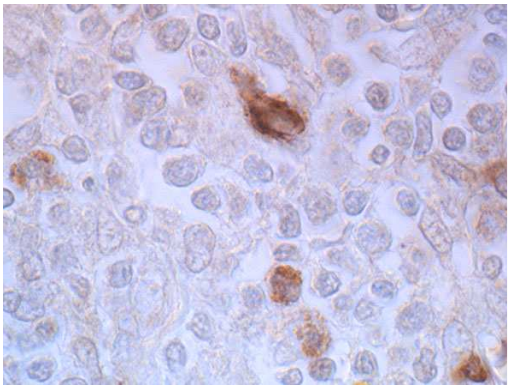
Pacjent	**Nadczynność**		**Niedoczynność**		**Eutyreoza**	
	ghrelina (pg/ml)	**obestatyna (pg/ml)**	**ghrelina (pg/ml)**	**obestatyna (pg/ml)**	**ghrelina (pg/ml)**	**obestatyna (pg/ml)**
JO	169,3	56,9	817,4	x	417,6	64
BW	250,5	71,9	378,8	x	222,4	x
MM	131,9	49,4	105,6	33,3	122,05	34
EA	183,9	52,7	103,3	108	114,9	104,9
AG	98,2	x	155	54,6	113,58	93,5
MH	152,4	x	306,12	84,2	287,94	57,8
DM	338,5	x	324,1	64	283,3	90,6
średnia ± SD	**189,2 ± 81**	**57,7 ± 9,9**	**312,9 ± 248,6**	**68,8 ±28,5**	**223,1 ± 115,2**	**74,1 ± 26,7**
TSH (uIU/ml)	0,006 ± 0,001		78,8 ± 29,9		1,5 ± 1,2	
fT_4 (pmol/l)	47,9 ± 26,5		4,5 ± 3,3		18,8 ± 3,6	
fT_3 (pmol/l)	20,4 ± 12,4		1,6 ± 1,1		5,1 ± 1,2	
BMI (kg/m^2)	19,2 ± 1,3		21,4 ± 2,2		20,8 ± 1,8	

4.2 Tkankowa ekspresja ghreliny i obestatyny w tarczycy

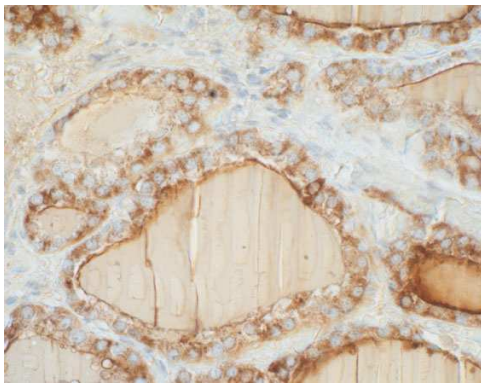
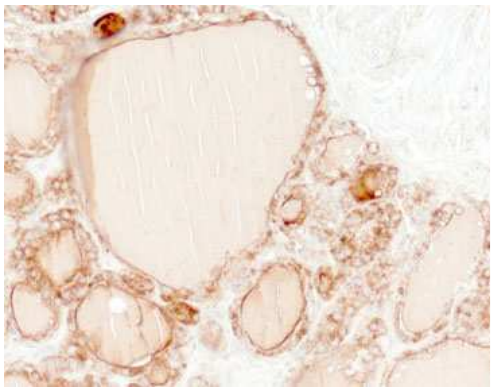
Ekspresję ghreliny obserwowano w komórkach pęcherzykowych i okołopęcherzykowych zdrowej tarczycy, wola guzowatego obojętnego oraz w komórkach nowotworów złośliwych tarczycy (ryc. 17).

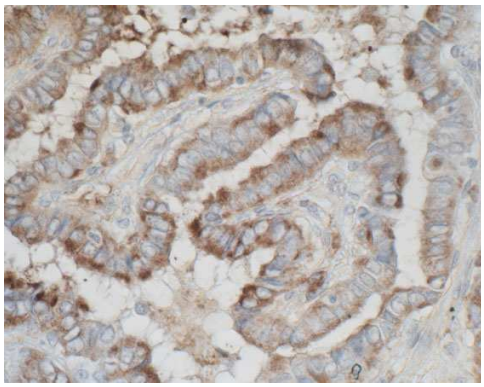
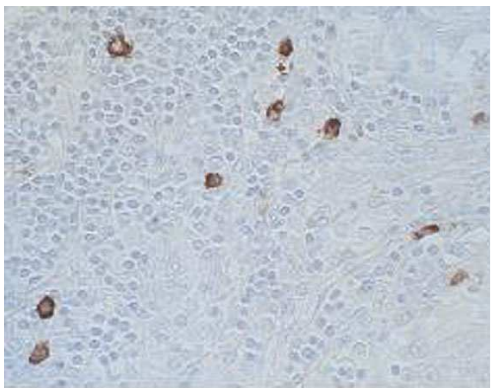
Nasilenie reakcji immunohistochemicznej w tyreocytach zdrowej tarczycy i wola guzowatego było niejednorodne. Ekspresja ghreliny w komórkach raka brodawkowatego i mieszanego raka pęcherzykowo-rdzeniastego była wyraźnie silniejsza. W raku rdzeniastym tarczycy obecność ghreliny wykazywano w pojedynczych komórkach nowotworowych.

17a  17b 

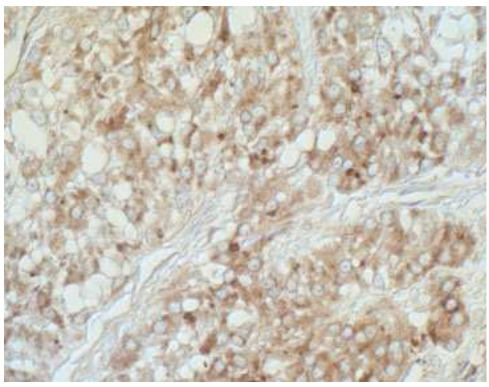
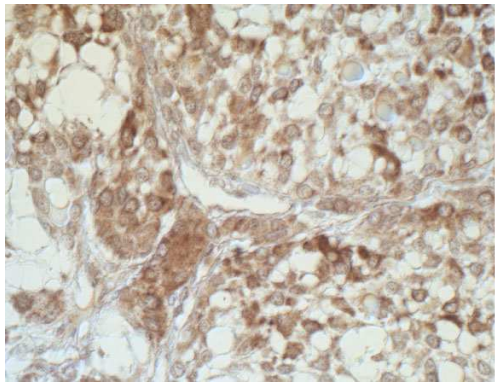
17c  17d 

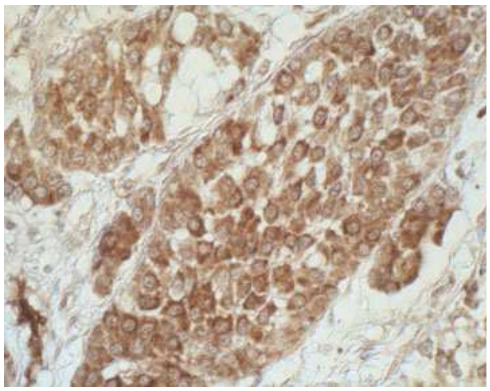
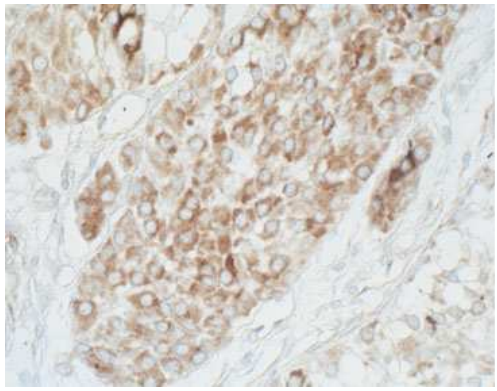
Ryc. 17 Immunohistochemiczna ekspresja ghreliny w zdrowej tarczycy (17a), wolu guzowatym obojętnym (17b), raku brodawkowatym tarczycy (17c) i raku rdzeniastym (17d). Technika ABC. Powiększenie obiektywu 40x (a,b,c) i 100x (d).

18a  18b 

18c  18d 

Ryc. 18 Immunohistochemiczna ekspresja obestatyny w zdrowej tarczycy (18a), wolu guzowatym obojętnym (18b), raku brodawkowatym tarczycy (18c) i raku rdzeniastym tarczycy (18d). Technika ABC. Powiększenie obiektywu 40x.

19a  19b 

19c  19d 

Ryc. 19 Koekspresja ghreliny (a, c) i obestatyny (b, d) w mieszanym raku pęcherzykowo-rdzeniastym tarczycy. Technika ABC. Powiększenie obiektywu 40x.

Pozytywna reakcja immunocytochemiczna na obestatynę obserwowana była głównie w komórkach C, rzadziej w komórkach pęcherzykowych zdrowej tarczycy i wola guzowatego obojętnego. Ponadto, wykazano obecność obestatyny w komórkach nowotworowych raka brodawkowatego, raka rdzeniastego i raka pęcherzykowo-rdzeniastego tarczycy (ryc. 18). Obestatyna występowała najczęściej w tej samej lokalizacji, w której stwierdzano ekspresję ghreliny. Immunoreaktywność obestatyny była jednak nierównomiernie nasilona i słabsza od ekspresji ghreliny. Wyraźną koekspresję obu peptydów stwierdzono w mieszanym raku pęcherzykowo-rdzeniastym tarczycy (ryc. 19).

5 DYSKUSJA

Zważywszy na główne mechanizmy regulujące stężenie ghreliny początkowo przypuszczano, do jakich zmian w wydzielaniu tego peptydu może dochodzić w zaburzeniach czynności tarczycy. Ze względu na towarzyszący nadczynności tarczycy nasilony apetyt, a zwłaszcza zwiększone spożycie węglowodanów, sugerowano, że objawy te wywołane są wzmożonym wydzielaniem ghreliny. Z kolei często stwierdzany w niedoczynności tarczycy przyrost masy ciała, według wcześniej obserwowanych zależności, powinien powodować zahamowanie jej produkcji.

W niniejszej pracy wykazano jednak, że u chorych z niedoczynnością tarczycy w przebiegu zapalenia tarczycy typu Hashimoto stężenie ghreliny w osoczu jest znacząco podwyższone w porównaniu z grupą osób zdrowych. Stwierdzono ponadto, że po wyrównaniu czynności tarczycy dochodzi u tych chorych do istotnego spadku stężenia ghreliny.

Dotychczasowe badania dotyczące zmian stężenia ghreliny u chorych z niedoczynnością tarczycy również wskazują na zwiększone wydzielanie tego peptydu (Ruchała 2007, Braclik i wsp., 2008, Gjedde i wsp., 2008, Kosowicz i wsp., 2010). Gjedde i wsp. (2008) wykazali, że w hypotyreozie w przebiegu przewlekłego zapalenia tarczycy stężenie ghreliny koreluje negatywnie ze stężeniem fT_4 i normalizuje się po uzyskaniu eutyreozy.

Nie wszyscy autorzy opisywali jednak wzrost wydzielania ghreliny w niedoczynności tarczycy. Altinova i wsp. (2006b) w grupie chorych z hypotyreozą towarzyszącą przewlekłemu zapaleniu tarczycy zaobserwowali spadek produkcji ghreliny. W związku z negatywną korelacją pomiędzy stężeniem peptydu a poziomem przeciwciał aTPO i aTg, dopatrywano się tutaj wpływu przeciwciał przeciwnarządowych. Wcześniej wykazano bowiem, że w innej chorobie autoimmunologicznej – celiakii dochodzi do zaburzeń w wydzielaniu ghreliny (Peracchi i wsp., 2003). Wg niektórych autorów natomiast w niedoczynności tarczycy stężenie ghreliny w osoczu nie zmienia się i jest

porównywalne z wartościami obserwowanymi u osób zdrowych (Giménez-Palop i wsp., 2005, Tanda i wsp., 2009*).*

W grupie chorych z niedoczynnością tarczycy po strumektomii całkowitej po 4-6 tygodniach od odstawienia L-tyroksyny nie zaobserwowano istotnych różnic w stężeniu ghreliny w porównaniu z grupą kontrolną. Należy zauważyć jednak, że średnie stężenie ghreliny u tych chorych przyjmowało wartość pośrednią pomiędzy stężeniem ghreliny u osób zdrowych a stężeniem ghreliny u chorych z niedoczynnością tarczycy w zapaleniu typu Hashimoto. Nie można wykluczyć, że ma to związek ze stopniem nasilenia zaburzeń czynności tarczycy. Po krótkim okresie niezażywania L-tyroksyny pacjenci zgłaszali bowiem miernie nasilone objawy hypotyreozy. Natomiast do grupy chorych z zapaleniem typu Hashimoto kwalifikowano chorych z nasiloną niedoczynnością tarczycy, pomijając stany nieznacznych zaburzeń hormonalnych. Miało to na celu podkreślenie różnic pomiędzy niedoczynnością tarczycy a eutyreozą. Wobec wykazanego wpływu TSH na stężenie ghreliny, nie można wykluczyć, że wyraźna hyperghrelinemia u chorych z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto ma związek z bardzo wysokimi wartościami TSH stwierdzanymi w tej grupie.

Stężenia ghreliny u chorych z nadczynnością tarczycy wykazywały tendencję do niższych wartości w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto, po uzyskaniu eutyreozy, pomimo wyraźnego wzrostu BMI badanej grupy, nie obserwowano spadku stężenia ghreliny.

Wyniki te wydają się potwierdzać wcześniejsze doniesienia wskazujące na zahamowanie wydzielania ghreliny w hypertyreozie (Riis i wsp., 2003, Giménez-Palop i wsp., 2005, Rojdmark i wsp., 2005, Altinova i wsp., 2006a, Ruchała 2007, Braclik i wsp., 2008, Tanda i wsp., 2009, Theodoropoulou i wsp., 2009). Niektórzy autorzy obserwowali również zwiększenie stężenia ghreliny u chorych z nadczynnością tarczycy po uzyskaniu eutyreozy (Riis i wsp., 2003, Tanda i wsp., 2009).

Dotychczas nie określono czynników wpływających na stężenie ghreliny w zaburzeniach czynności tarczycy. Zasugerowano, że w nadczynności tarczycy,

wobec hiperinsulinemii wynikającej ze zwiększenia ilości przyjmowanego pokarmu, czynnikiem redukującym stężenie ghreliny może być insulina. Riis i wsp. (2003) wykazali, że w hypertyreozie stężenie ghreliny na czczo jest niższe niż u osób zdrowych i, podobnie jak w warunkach fizjologicznych, obniża się po posiłku. W badaniu tym oceniono także stężenie ghreliny w osoczu krwi, stosując metodę euglikemicznej klamry metabolicznej. Polega ona na utrzymaniu glikemii na poziomie 5 mmol/l przy znacznej hiperinsulinemii poprzez zastosowanie ciągłego dożylnego wlewu insuliny krótkodziałającej i 20% roztworu glukozy. Stwierdzono, że w nadczynności tarczycy w warunkach podwyższonego stężenia insuliny dochodzi do obniżenia stężenia ghreliny. Podobny spadek obserwowano u tych samych chorych po uzyskaniu eutyreozy oraz w grupie kontrolnej.

Przypuszczenia dotyczące wpływu insuliny na wydzielanie ghreliny poparło badanie zespołu Gimenéz-Palop (2005), który wykazał, że niskiemu stężeniu ghreliny u chorych z nadczynnością tarczycy towarzyszy wysokie stężenie insuliny i wysoki wskaźnik insulinooporności HOMA-IR na czczo. W wynikach nie odnotowano zależności pomiędzy stężeniem ghreliny a BMI, obwodem pasa chorych czy zawartością tłuszczowej masy ciała. Na podstawie tych badań stwierdzono, że niskie stężenie ghreliny u chorych z nadczynnością tarczycy może wynikać z towarzyszącej hypertyreozie hyperinsulinemii i insulinooporności.

Theodoropoulou i wsp. (2009) oceniali stężenie insuliny i ghreliny w teście obciążenia glukozą u chorych z nadczynnością tarczycy przed i po leczeniu tyreostatykiem. Stwierdzili, że niskie stężenie ghreliny na czczo dodatkowo ulega spadkowi po podaniu glukozy i koreluje negatywnie ze stężeniem insuliny w osoczu.

Wnioski sugerujące, jakoby hiperinsulinemia miałaby być główną przyczyną zahamowania produkcji ghreliny należy traktować jednak jako wstępne przypuszczenia, zwłaszcza w kontekście wcześniejszych badań, w których stwierdzono, że insulina nie jest w stanie samodzielnie zmniejszyć wydzielania ghreliny (Caixas i wsp., 2002, Williams i Cummings, 2005).

W związku z tym, że ghrelina jest silnym stymulatorem wydzialania hormonu wzrostu (Arvat i wsp., 2000, Date i wsp., 2000a, Takaya i wsp., 2000, Malagón i wsp., 2003, Popovic i wsp., 2003), uważano, że kolejnym prawdopodobnym elementem łączącym czynność tarczycy i produkcję ghreliny może być hormon wzrostu. Produkcja GH i IGF-1 uzależniona jest od czynności tarczycy i odbywa się w sposób prawidłowy tylko w stanie eutyreozy (Miell i wsp., 1993, Laron i wsp., 2003). Wykazano, że w niedoczynności tarczycy produkcja GH i IGF-1 jest osłabiona (Valcavi i wsp., 1987, Valcavi i wsp., 1992). W nadczynności tarczycy natomiast dochodzi nawet do czterokrotnego wzrostu stężenia GH (Iranmanesh i wsp., 1991). Ponadto, stymulacja produkcji IGF-1 przez hormony tarczycy może odbywać się także w mechanizmie niezależnym od GH (Gaspard i wsp., 1978, Holder i wsp., 1980, Näntö-Salonen i wsp., 1993).

Dowiedziono, że istnieje interakcja pomiędzy hormonami tarczycy a ghrelino-zależną stymulacją GH. U chorych z nadczynnością tarczycy wyrzut GH po podaniu ghreliny był niższy w porównaniu z grupą osób zdrowych (Nascif i wsp., 2007). Z kolei badania przeprowadzone na zwierzętach wykazały, że niedoczynność tarczycy powoduje zwiększone wydzielanie wzrost GH pod wpływem ghreliny (Lee i wsp., 2001).

Rozważano zatem, czy bezpośrednia stymulacja wydzielania hormonu wzrostu i IGF-1 przez hormony tarczycy mogłaby na drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego powodować spadek stężenia ghreliny. U pacjentów z niedoczynnością tarczycy hyperghrelinemia stanowiłaby z kolei element mechanizmu kompensującego niedobór GH. Wykazano jednak, że wydzielanie ghreliny nie jest uzależnione od stężenia GH w osoczu (Caminos i wsp., 2002, Freda i wsp., 2003).

Warto zwrócić uwagę na wnioski wynikające z badania Morovat i Dauncey (1998), którzy wykazali, że wpływ hormonów tarczycy na produkcję GH i IGF-1 nie odbywa się na zasadzie bezpośredniej zależności, ale uwarunkowany jest stanem metabolicznym organizmu np. stanem odżywienia. Ghrelina mogłaby być zatem elementem pośredniczącym w tym mechanizmie regulacyjnym. Wobec powyższych obserwacji należy przyjrzeć się nadczynności i niedoczynności

tarczycy pod kątem zaburzeń stanu metabolicznego, gdyż przypuszczalnie to one są wytłumaczeniem zmian stężenia ghreliny u tych chorych.

W nadczynności tarczycy wobec nadmiaru hormonów tarczycy dochodzi do przyspieszenia przemian metabolicznych i nasilonego katabolizmu. Niskie stężenie ghreliny powoduje u tych chorych spowolnienie przemiany materii i zahamowanie utraty energii, która w nadczynności tarczycy jest znacząco zwiększona. Nie można więc wykluczyć, że ghrelina działa jako czynnik kompensujący zaburzenia metaboliczne występujące w hypertyreozie. Tym bardziej, że potwierdzono hamujący wpływ ghreliny na oksydację wolnych kwasów tłuszczowych, co bezpośrednio świadczy o spowolnieniu procesów katabolicznych (Wren i wsp., 2000, Nakazato i wsp., 2001).

W hypotyreozie natomiast, pomimo przyrostu masy ciała, niedobór hormonów tarczycy uniemożliwia właściwe spożytkowanie zasobów energetycznych. Podobna sytuacja występuje podczas głodzenia, kiedy dochodzi do rzeczywistego braku substratów metabolicznych. Niedoczynność tarczycy można zatem rozpartywać w kategorii stanów z ujemnym bilansem energetycznym tj. anoreksji, bulimiai, czy kacheksji w przebiegu chorób przewlekłych i nowotworowych, którym towarzyszy wzrost stężenia ghreliny (Inui 1999, Shiiya i wsp., 2002, Scacchi i wsp., 2003, Tacke i wsp., 2003, Garcia i wsp., 2005). Hyperghrelinemia w tych warunkach jest zjawiskiem wręcz pożądanym, jako że stymuluje przemiany metaboliczne i pozwala na odpowiednie wykorzystanie energii. Prometaboliczne działanie ghreliny potwierdzono w badaniach na zwierzętach, gdzie podawanie ghreliny szczurom powodowało wzrost wskaźnika oddechowego (RQ) przy braku zmian w wydatku energetycznym czy aktywności fizycznej, co świadczyło o zwiększonym metabolizmie węglowowanów i tłuszczów (Tschop 2000).

Należy również zauważyć, że we wspomnianych przewlekłych stanach chorobowych oprócz hyperghrelinemii obserwuje się spadek stężenia fT_3 („zespół niskiej T_3”) (Moshang i wsp., 1975, Persson i wsp., 1985), co dodatkowo może wskazywać na zależność pomiędzy ghreliną i czynnością tarczycy. Troisi i wsp. (2005) zauważyli, że w anoreksji i bulimii stężenie ghreliny koreluje negatywnie

ze stężeniem wolnych hormonów tarczycy. Rozpatrując zaburzenia stanu metabolicznego nie wynikające bezpośrednio z patologii tarczycy, można to zjawisko tłumaczyć jako podwójne zaoszczędzenie energii. Głodzenie powoduje bowiem wzrost stężenia ghreliny jako czynnika działającego prometabolicznie, a z drugiej strony zahamowanie produkcji hormonów tarczycy prowadzi do obniżenia utraty energii. Badania przeprowadzone podczas krótkotrwałego głodzenia u szczurów potwierdziły wzrost stężenia ghreliny przy spadku stężenia hormonów tarczycy (Ruchała 2007).

W warunkach hyper- lub hypotyreozy nie można już mówić o prawidłowej odpowiedzi tarczycy na zaburzenia stanu metabolicznego organizmu. W tej sytuacji rolę czynnika kompensującego powstałe zaburzenia może spełniać ghrelina, a powiązanie pomiędzy jej produkcją a czynnością tarczycy wiedzie najprawdopodobniej przez podwzgórze, które jest głównym ośrodkiem regulującym przemiany energetyczne organizmu.

Jak już wspomniano powyżej, ghrelina wykazuje działanie prometaboliczne poprzez swoje receptory w podwzgórzu (Papotti i wsp., 2000, Inui 2001, Wren i wsp., 2001a, Gnanapavan i wsp., 2002, Lawrence i wsp., 2002, Schaller i wsp., 2003). Produkowana lokalnie, ale także na drodze endokrynnej i poprzez stymulację włókien nerwu błędnego powoduje aktywację neuronów jądra łukowatego, a następnie jąder bocznych podwzgórza (Hewson i Dickson, 2000, Toshinai i wsp., 2003, Couce i wsp., 2006). Prowadzi to m.in. do uwolnienia peptydów oreksygennych: neuropeptydu Y (NPY) i białka Agouti (AgRP) oraz do zahamowania działających anoreksygennie neuronów zawierających proopiomelanokortynę – POMC oraz transkryptu regulowanego kokainą i amfetaminą - CART (Schwarz i wsp., 2000, Chen i wsp., 2004).

W jądrze łukowatym (ARC), jądrze brzuszno-przyśrodkowym (VMN), jądrze grzbietowo-przyśrodkowym (DM), jądrze przykomorowym (PVN) i okolicy bocznej podwzgórza wykazano również ekspresję receptorów hormonów tarczycy. Aktywność dejodynazy typu 2 występującej w tej części OUN zwiększa się podczas głodzenia, co świadczy o udziale T_3 w odpowiedzi na niedobory

energetyczne. Wzmożona ekspresja dejodynazy 2 i nasilona konwersja T_4 do T_3 w obrębie jąder podwzgórza prowadzi w konsekwencji do spadku TRH.

W warunkach niedoboru hormonów tarczycy wzrost stężenia ghreliny powoduje zatem aktywację jąder podwzgórza, które w warunkach eutyreozy byłyby pobudzane przez trójjodotyroninę. W konsekwencji dochodzi do uruchomienia obwodowych szlaków regulujących procesy energetyczne i nasilenia metabolizmu. Z kolei w nadczynności tarczycy niskie stężenie ghreliny powoduje zmniejszenie tempa przemian metabolicznych i redukcję patologicznie zwiększonego wydatku energetycznego.

Odpowiedzią hormonów tarczycy na stan energetyczny jest także ich regulujący wpływ na apetyt. Trójjodotyronina powoduje aktywację neuronów zawierających NPY, a z drugiej strony działa supresyjnie na CART i POMC (Ishii i wsp., 2003, Kong i wsp., 2004). W badaniach na zwierzętach zaobserwowano, że myszy pozbawione D2 nie wykazują wzrostu NPY i mają osłabione poczucie głodu, które normalizuje się po egzogennym podaniu T_3 (Herwig i wsp., 2008). Istnieje ponadto anatomiczne powiązanie pomiędzy neuronami zawierającymi NPY a neuronami produkującymi TRH (Herwig i wsp., 2008).

Wobec nasilonego apetytu u chorych z nadczynnością tarczycy stwierdzenie niskiego stężenia ghreliny było zaskakującym wynikiem. Niemniej zmniejszenie produkcji ghreliny może być i tym razem elementem mechanizmu kompensującego działanie innych czynników prowadzących do wzrostu łaknienia.

Jak wspomniano powyżej, wzmożony apetyt towarzyszące hypertyreozie w znacznym stopniu wynika z bezpośredniego działania hormonów tarczycy na jądra podwzgórza. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że podanie antagonistów receptora NPY1 powoduje zahamowanie łaknienia u zwierząt z nadczynnością tarczycy (Ishii i wsp., 2003).

Dodatkowo, rolę w stymulacji apetytu może odgrywać leptyna wpływająca na neurony podwzgórza. Wykazano, że u szczurów otrzymujących egzogenną trójjodotyroninę stężenie leptyny w osoczu było istotnie obniżone (Ishii i wsp., 2003). Spadkowi leptyny towarzyszyła osłabiona ekspresja mRNA POMC i CART oraz nasilona ekspresja NPY (López i wsp., 2002, Ishii i wsp., 2003).

Kolejnym czynnikiem zwiększającym łaknienie w hypertyreozie jest zaburzony stosunek stężeń serotoniny (5-hydroksy – tryptaminy, 5-HT) i noradrenaliny (NAA). Stwierdzono, że przy wysokim stosunku serotoniny do noradrenaliny zmniejsza się spożycie węglowodanów, a następnie także całkowita ilość przyjmowanego pokarmu (Shor-Posner i wsp., 1986, Pijl i wsp., 1991). Odwrotnie, niskie stężenie serotoniny i wysokie stężenie noradrenaliny pobudzają łaknienie (Leibowitz 1986, Paez i Leibowitz, 1993).

W nadczynności tarczycy dochodzi do nasilonej aktywności układu współczulnego i wzrostu stężenia katecholamin w osoczu. Dodatkowo, wychwyt komórkowy NAA jest upośledzony, gdyż jej transport przezbłonowy konkuruje z transportem HT (Blondeau i wsp., 1993, Zhou i wsp., 1990, Burggraaf i wsp., 2001). W konsekwencji w nadczynności tarczycy stosunek 5-HT/NAA w osoczu jest obniżony, co skutkuje nasilonym apetytem, a zwłaszcza zwiększonym spożyciem węglowodanów (Pijl i wsp., 2001). Wzmożona aktywność układu współczulnego w hypertyreozie sprzyja stymulacji apetytu również poprzez bezpośrednią aktywację postsynaptycznych receptorów adrenergicznych. Ponadto, stymulacja układu współczulnego i osłabienie sygnału z włókien przywspółczulnych nerwu błędnego przyczynia się do spadku wydzielania ghreliny (Burggraaf i wsp., 2001).

Dowodów dla poparcia teorii kompensacyjnych zmian stężeń ghreliny w zaburzeniach czynności tarczycy dostarczyło badanie Kluge i wsp. (2010), którzy wykazali, że podanie egzogennej ghreliny powoduje wzrost stężenia fT_4 oraz obniżenie TSH. Wcześniej w badaniach na zwierzętach zaobserwowano, że ghrelina egzogenna podana dokomorowo prowadzi do spadku stężenia TSH (Wren i wsp., 2000).

Zmiany stężenia ghreliny u chorych z zaburzeniami czynności tarczycy mogą wynikać ponadto ze zmian w klirensie nerkowym peptydu. W niedoczynności tarczycy dochodzi do zmniejszenia przepływu nerkowego i spadku współczynnika przesączania kłębuszkowego (GFR), a w konsekwencji do wzrostu stężenia kreatyniny i innych substancji w osoczu. W nadczynności tarczycy sytuacja kształtuje się wprost przeciwnie – przepływ nerkowy

i przesączanie kłębuszkowe są zwiększone (Iglesias i Diez 2009). Wykazano, że w warunkach hypertyreozy dochodzi do szybszej eliminacji m.in. PRL i GH z osocza (Taylor i wsp., 1969). Nie można zatem wykluczyć, że u chorych z niedoczynnością tarczycy wzrost stężenia ghreliny jest skutkiem utrudnionej eliminacji peptydu z krwioobiegu. Natomiast u chorych z nadczynnością tarczycy spadek stężenia ghreliny może wynikać z jej szybszego wydalania. W związku z tym, że aktywność enzymów uczestniczących w deacylacji ghreliny (m.in. butyrylocholinesterazy) regulowana jest przez hormony tarczycy, hypertyreoza może także przyspieszać proces jej degradacji (De Vriese i wsp., 2004).

Wpływ na stężenie ghreliny mogą mieć również zaburzenia gospodarki lipidowej towarzyszące dysfunkcjom tarczycy. Cząsteczki LDL, HDL, VHDL i TAG wiążą bowiem ghrelinę acylowaną (Beaumont i wsp., 2003, De Vriese i wsp., 2007). Zależność pomiędzy stężeniem poszczególnych frakcji lipidowych a stężeniem ghreliny nie została jeszcze dokładnie określona. Niektórzy wskazują na pozytywną korelację pomiędzy stężeniem ghreliny a HDL i LDL (Purnell i wsp., 2003, Fagerberg i wsp., 2003). Choi i wsp. (2004) nie stwierdzili natomiast wpływu HDL, TAG i LDL na stężenie ghreliny.

Analiza stężeń drugiego z peptydów – obestatyny wykazała, że u chorych z niedoczynnością tarczycy po strumektomii całkowitej jej stężenie jest wyższe niż u osób zdrowych. W niedoczynności tarczycy w zapaleniu typu Hashimoto, pomimo wyjściowych stężeń obestatyny nie różniących się istotnie od grupy osób zdrowych, po wyrównaniu czynności tarczycy L-tyroksyną wykazano znaczący spadek stężenia obestatyny, podobny do zmian w stężeniu ghreliny. Nie stwierdzono różnic w stężeniu obestatyny pomiędzy nadczynnością tarczycy a grupą kontrolną. W całościowo analizowanej grupie kontrolnej i badanej odnotowano natomiast istotną statystycznie pozytywną korelację pomiędzy stężeniem ghreliny i obestatyny.

Równolegle przebiegające zmiany stężeń ghreliny i obestatyny skłaniają do rozważenia ich wzajemnej zależności. Dotychczasowy stan wiedzy na temat tych peptydów pozwala twierdzić, że produkowane są one przez ten sam rodzaj komórek, na drodze posttranslacyjnych przemian wspólnego prekursora – prepro-

ghreliny. Zmianom w stężeniu ghreliny powinny zatem towarzyszyć podobne zmiany stężeń obestatyny, na co mogą wskazywać wyniki tej pracy.

Dotychczasowe jednoczesne analizy stężeń ghreliny i obestatyny przeprowadzone u osób szczupłych i otyłych na czczo wykazały, że stężenia obu peptydów korelują ze sobą pozytywnie przy negatywnej zależności od BMI (Beasley i wsp., 2009). Podobnie w anoreksji zwiększone stężenie obestatyny towarzyszyło wzmożonej produkcji ghreliny (Nakahara i wsp., 2008, Germain i wsp., 2010).

Zespół Monteleone (2008) jako jedyny zaobserwował, że w anoreksji dochodzi do wzrostu stężenia ghreliny przy spadku stężenia obestatyny w osoczu. Niektóre badania wydają się wskazywać na możliwość niezależnej produkcji ghreliny i obestatyny. Zaobserwowano, że w komórkach nowotworowych raka piersi i raka prostaty dochodzi do utraty egzonu 3 genu prepro-ghreliny (Jeffery i wsp., 2005, Yeh i wsp., 2005), który, jak się później okazało, jest odpowiedzialny za powstanie obestatyny. Z drugiej strony, Seim i wsp. (2010) wykazali, że na drodze alternatywnej transkrypcji genu prepro-ghreliny może powstawać cząsteczka proghreliny pozbawiona fragmentu związanego z produkcją ghreliny. Dalsze przemiany zmienionej w ten sposób proghreliny prowadzą do powstania wyłącznie obestatyny. W pewnych warunkach zatem synteza ghreliny i obestatyny może przebiegać niezależnie, a zmiany stężeń obu peptydów nie przebiegają równolegle.

Wykazana w tej pracy pozytywna korelacja między ghreliną i obestatyną stanowi najprawdopodobniej zaprzeczenie wstępnie zakładanej przez Zhanga i wsp. (2005) teorii przeciwnych właściwości siostrzanych peptydów. W rozważanym przez nich układzie zależności wzrost stężenia jednego z peptydów powinien powodować spadek stężenia drugiego.

W dalszym ciągu trwają dyskusje, czy w ogóle rozpatrywać obestatynę jako peptyd wykazujący działanie biologiczne, czy tylko jako peptyd towarzyszący ghrelinie. Nie można jednak wykluczyć, że obestatyna, powstając równolegle z ghreliną, wpływa modulująco na jej działanie. Wcześniejsze badania wykazały już bowiem podobne właściwości obestatyny w zakresie czynności

komórek somatotropinowych, w których hamowała ona stymulowane ghreliną wydzielanie GH (Zizzari i wsp., 2007).

Wyjaśnieniu ewentualnej roli ghreliny i obestatyny jako lokalnych modulatorów czynności tarczycy częściowo może posłużyć analiza ekspresji obu peptydów na poziomie tkanki gruczołu.

W poniższej pracy ekspresję ghreliny odnotowano w tyreocytach i komórkach okołopęcherzykowych zarówno zdrowej tarczycy, jak i wola guzowatego obojętnego oraz nowotworów złośliwych tarczycy.

Dotychczas przeprowadzone badania nie pozwoliły na sprecyzowanie wniosków dotyczących obecności ghreliny w tarczycy. Trwają dyskusje nad różnicami w ekspresji tego peptydu w zdrowej tkance gruczołu, zmianach łagodnych i złośliwych tarczycy.

Występowanie ghreliny w komórkach okołopęcherzykowych, zarówno zdrowej tarczycy, jak i w zmianach nowotworowych odnotowano już we wcześniejszych badaniach (Kanamoto i wsp., 2001, Nakai i wsp., 2004, Raghay i wsp., 2006, Ruchała 2007).

Kanamoto i wsp. (2001) po raz pierwszy zaobserwowali, że komórki C raka rdzeniastego tarczycy (MTC – medullary thyroid carcinoma) mają zdolność wydzielania ghreliny. Metodą Northern blot wykazał on ekspresję mRNA prepro-ghreliny w komórkach linii TT uważanej za najbardziej stabilną linię komórek MTC. Ponadto, metodą radioimmunologiczną potwierdził obecność ghreliny w ekstraktach komórek, a ocena immunocytochemiczna pozwoliła na sprecyzowanie lokalizacji cytoplazmatycznej tego peptydu.

Niejako uzupełnieniem tych badań była praca zespołu Raghay (2006), który metodami molekularnymi (RT-PCR) i immunohistochemicznymi wykazał obecność ghreliny w komórkach okołopęcherzykowych raka rdzeniastego, brodawkowatego i pęcherzykowego tarczycy, ale również w komórkach C zdrowej tarczycy. Stwierdzono zatem, że komórki okołopęcherzykowe mają zdolność produkcji ghreliny zarówno w zdrowej tkance, jak i nowotworach gruczołu tarczowego. Analiza ekspresji immunohistochemicznej ghreliny w wolu guzowatym obojętnym potwierdziła obecność peptydu głównie w komórkach C

przy znacznie słabszej reakcji w komórkach pęcherzykowych tarczycy (Ruchała 2007).

Na podstawie silnej ekspresji ghreliny w komórkach okołopęcherzykowych zasugerowano, że ghrelina może być nowym markerem raka rdzeniastego tarczycy. Aktualnie za główny wskaźnik diagnostyczny i prognostyczny u pacjentów z MTC uznaje się kalcytoninę. Stężenie kalcytoniny może być jednak podwyższone również w innych guzach neuroendokrynnych, w raku piersi, raku płuca, a także w nienowotworowych chorobach tarczycy np. w zapaleniu tarczycy typu Hashimoto (Morpurgo i wsp., 2005). W związku z embriologicznym pochodzeniem komórek C, rak rdzeniasty tarczycy oprócz kalcytoniny produkuje także szereg innych hormonów i peptydów neuroendokrynnych tj. ACTH, serotoninę, chromograninę A i VIP (vasoactive intestinal peptide). Skoro źródłem ghreliny są komórki neuroendokrynne żołądka, nie można wykluczyć, że komórki okołopęcherzykowe tarczycy również uczestniczą w jej produkcji.

Dotychczasowe badania nie pozwalają jednak na uznanie ghreliny jako markera MTC. Nie stwierdzono różnic w stężeniu ghreliny w osoczu pacjentów z rakiem rdzeniastym tarczycy a grupą kontrolną osób zdrowych i osób z wolem guzowatym obojetnym (Morpurgo i wsp., 2005). Test z pentagastryną obok wzrostu stężenia kalcytoniny powodował w równym stopniu zwiększenie produkcji ghreliny, a spektakularny wzrost stężenia ghreliny obserwowano tylko u pacjentów z patologiczną stymulacją kalcytoniny. Nie odnotowano także różnic w stężeniu ghreliny u chorych po strumektomii z powodu MTC w porównaniu z pacjentami przed operacją. Na podstawie tych badań można zatem jedynie uznać, że istotnym miejscem produkcji ghreliny są komórki C, jednak udział samej tarczycy w tym procesie nie jest znaczący.

Ekspresja ghreliny w tyreocytach jest ciągle przedmiotem dyskusji. Raghay i wsp. (2006), analizując reakcję immunohistochemiczną na ghrelinę w zdrowej tkance i nowotworach tarczycy, nie stwierdzili obecności peptydu w komórkach pęcherzykowych. Zespół Karaoglu (2009) opisał ekspresję ghreliny w tyreocytach zdrowej tarczycy, tarczycy w zapaleniu typu Hashimoto oraz w raku brodawkowatym tarczycy. Interesującym wynikiem była wykazana silna ekspresja

ghreliny w komórkach pęcherzykowych tarczycy płodowej (Volante 2003). Na podstawie tych badań zasugerowano, że tarczyca może być istotnym źródłem peptydu w okresie prenatalnym. Volante i wsp. (2003) nie stwierdzili ekspresji ghreliny w komórkach pęcherzykowych zdrowej tarczycy ludzi dorosłych. Wykazali natomiast jej obecność w tyreocytach guzów łagodnych i złośliwych pochodzenia folikularnego, co wskazywałoby na re-ekspresję peptydu w przypadku nowotworów pęcherzykowych tarczycy.

W niniejszej pracy wykazano obecność ghreliny w komórkach pęcherzykowych tarczycy. Nie można wykluczyć, że występowanie tego peptydu w miejscu produkcji hormonów tarczycy może mieć związek z modulującą rolą ghreliny w zakresie funkcji wydzielniczej gruczołu tarczowego. Wskazywałaby na to również obserwowana wcześniej w tarczycy szczura silna ekspresja ghreliny w części szczytowej tyreocytów, która jest miejscem egzocytozy tyreoglobuliny i peroksydazy tyrozynowej, transportu jodków do koloidu, jodowania tyreoglobuliny, a także endocytozy jodowanej tyreoglobuliny (Ruchała 2007).

Dodatkowo za znaczeniem funkcjonalnym ghreliny w tarczycy przemawia wychwyt ghreliny egzogennej w tym gruczole (Ruchała 2007). Dożylne podanie szczurom peptydu znakowanego ^{125}I, a następnie analiza radioaktywności izotopu w 27 narządach pobranych po autopsji pozwoliła na ocenę rozmieszczenia narządowego ghreliny w organizmie. Aktywność znakowanego peptydu w gruczole tarczowym należała do najwyższych, nawet po zablokowaniu wychwytu ^{125}I poprzez podanie zwierzętom przed badaniem płynu Lugola. Ponadto, zaobserwowano, że w ciągu pierwszych dwóch godzin po podaniu znakowanej ghreliny radioaktywność odczytywana w tarczycy utrzymywała się na stałym poziomie. Swoista kumulacja peptydu może zatem wskazywać na aktywność biologiczną ghreliny w gruczole tarczowym.

Odrębnym zagadnieniem jest szeroko dyskutowana ekspresja ghreliny w zmianach łagodnych i złośliwych tarczycy. Zhang i wsp. (2006) metodą immunohistochemiczną stwierdzili obecność ghreliny w komórkach nowotworowych raka brodawkowatego, pęcherzykowego, rdzeniastego i anaplastycznego tarczycy. Nie wykazali natomiast ekspresji ghreliny

w podostrym zapaleniu tarczycy, zapaleniu typu Hashimoto, chorobie Graves-Basedowa, wolu guzowatym, ani w zdrowej tarczycy.

Wprost przeciwne wyniki uzyskał zespół Karaoglu (2009), który metodą immunohistochemiczną wykazał silną ekspresję ghreliny w komórkach pęcherzykowych zdrowej tkanki tarczycy i w zapaleniu typu Hashimoto, a znacznie słabszą w raku brodawkowatym tarczycy. Potwierdził on powyższe obserwacje metodą radioimmunologiczną, analizując stężenie peptydu w homogenatach tkankowych.

Rozbieżności w uzyskiwanych do tej pory wynikach skłaniają do rozważenia wpływu ghreliny na wzrost, różnicowanie i czynność komórek tarczycy. Zagadnienie to jest tym bardziej interesujące w świetle szeroko rozważanej roli ghreliny w proliferacji komórkowej.

Obecnośc receptorów ghreliny w tkance tarczycy - zarówno GHS-R1a, jak i GHS-R1b została szeroko udokumentowana (Cassoni i wsp., 2000, Papotti i wsp., 2000, Gnanapavan i wsp., 2002, Ueberberg i wsp., 2009). Najsilniejszą ekspresję GHS-R wykazano w raku zróżnicowanym tarczycy, następnie w zdrowej tkance tarczycy, a najsłabszą w raku anaplastycznym (Cassoni i wsp., 2000). Nie stwierdzono występowania GHS-R w raku rdzeniastym tarczycy.

Wobec silnej ekspresji ghreliny w komórkach C i potwierdzonej obecności receptorów GHS-R na komórkach pęcherzykowych tarczycy ghrelina produkowana w komórkach okołopęcherzykowych mogłąby wpływać na tyreocyty na drodze parakrynowej. Cassoni i wsp. (2000) wykazali, że syntetyczne sekretagogi powodują zahamowanie procesów proliferacyjnych w obrębie zróżnicowanych raków tarczycy (raka brodawkowatego i pęcherzykowego) oraz raka anaplastycznego. Zespół Volante (2003), stosując stosunkowo wysokie stężenia ghreliny (100 nmol/l do 1 μmol/l) udowodnił, że także endogenny peptyd hamuje proliferację komórek raka brodawkowatego i anaplastycznego tarczycy. W związku z tym, że zahamowanie wzrostu raka niezróżnicowanego wymagało wyższych stężeń ghreliny, podejrzewano, że komórki te posiadają zmodyfikowany receptor ghreliny lub jego powinowactwo do tego peptydu jest mniejsze. Wyniki te mogłyby zatem

świadczyć o działaniu ochronnym wysokich stężeń ghreliny na progresję zmian nowotworowych.

Hamujący wpływ ghreliny na proliferację komórkową zaobserwowano także w raku piersi i raku drobnokomórkowym płuca (Cassoni i wsp., 2001, Cassoni i wsp., 2006). W raku piersi działanie antyproliferacyjne ghreliny było niezależne od typu histopatologicznego nowotworu, jego stopnia zaawansowania czy indeksu proliferacyjnego (Cassoni i wsp., 2001). Na efekt badania wpływał wyłącznie stopnień zróżnicowania komórek. Najsilniejsze wiązanie ghreliny wykazywały guzy dobrze zróżnicowane, a najsłabsze - guzy niskozróżnicowane.

Należy jednak przyznać, że prace wskazujące na proproliferacyjne działanie ghreliny są liczniejsze. Stwierdzono, że stymuluje ona wzrost i różnicowanie komórek kory nadnerczy, preadipocytów, komórek β trzustki, komórek nabłonka żołądka i osteoblastów (Baldanzi i wsp., 2002, Petersson i wsp., 2002, Andreis i wsp., 2003, Kim i wsp., 2004, Mazzocchi i wsp., 2004, Brzozowski i wsp., 2004, Brzozowski i wsp., 2005, Fukushima i wsp., 2005, Maccarinelli i wsp., 2005, Granata i wsp., 2006, Park i wsp., 2008). Wśród tkanek nowotworowych silną proliferację komórkową pod wpływem ghreliny zaobserwowano w komórkach PC-3 raka prostaty (Jeffery i wsp., 2002), w gruczolakoraku trzustki (Duxbury i wsp., 2003), gruczolaku wątrobowokomórkowym (Murata i wsp., 2002) i guzach przysadki typu somatotropinoma (Nanzer i wsp., 2004).

W opozycji do badania Cassoni i wsp. (2001) dotyczącego antyproliferacyjnego działania ghreliny w raku piersi znajduje się praca zespołu Jeffery (2005). Wykazał on, że ghrelina acylowana stymuluje proliferację komórek raka piersi nawet o 36%. Różnica w wynikach obydwu badań może wynikać z zastosowanych stężeń ghreliny. W pierwszym komórki inkubowano w znacznie wyższych stężeniach (1μM), które można uznać za cytotoksyczne. Jeffery i wsp. użyli natomiast fizjologicznych stężeń ghreliny (110-120pM), co przemawia za wiarygodnością wyników ich badań.

Kolejnych dowodów na proproliferacyjne działanie ghreliny dostarczyło badanie przeprowadzone na nowotworowych liniach komórkowych białaczki

erytrocytarnej (De Vriese i wsp., 2005). Wykazano, że ghrelina produkowana przez te komórki stymuluje ich proliferację nawet o 40%. Nie obserwowano takiego działania po podaniu przeciwciał przeciwghrelinowych.

Stwierdzono, że ghrelina działa proproliferacyjnie także na komórki PC-3 raka prostaty (Jeffery i wsp., 2002, Yeh i wsp., 2005). Jest to wynik tym bardziej interesujący, że nie stwierdzono ekspresji ghreliny i jej receptorów w zdrowej tkance gruczołu krokowego, a wykazano ją w łagodnym przeroście oraz raku prostaty (Jeffery i wsp., 2002). Dodatkowo, stwierdzono, że w osoczu krwi chorych z rakiem prostaty stężenie ghreliny acylowanej jest wyższe niż u chorych z łagodnym przerostem prostaty i u osób zdrowych (Malendowicz i wsp., 2009). Być może kolejne badania przyniosą odpowiedź na pytanie, czy ghrelina acylowana ma związek z powstawaniem raka prostaty, czy też inne czynniki związane z rakiem prostaty wpływają na acylację ghreliny.

Zakładając stymulujący wpływ ghreliny na proliferację komórek nowotworowych należy w tym miejscu również zastanowić się, czy jest ona pierwotnym czynnikiem inicjującym kancerogenezę, czy może elementem wtórnego mechanizmu powodującego dalszy rozwój nowotworu. Obserwowany bowiem u chorych z nowotworem złośliwym ujemny bilans energetyczny powoduje zwiększenie wydzielania ghreliny jako czynnika działającego prometabolicznie. Lokalne proproliferacyjne działanie peptydu powodujące wzrost guza nowotworowego może być zatem niepożądanym następstwem hyperghrelinemii.

Na temat stymulowanej przez ghrelinę proliferacji komórkowej można też spojrzeć z drugiej strony. Karaoglu i wsp. (2009) stwierdzili, że ekspresja ghreliny w raku brodawkowatym tarczycy jest słabsza niż w zdrowej tkance i zapaleniu tarczycy typu Hashimoto. Podobne obserwacje dotyczą raka żołądka, przełyku, trzustki oraz nerki (Duxbury i wsp., 2003, Aydin i wsp., 2005, Mottershead i wsp., 2007, Dagli i wsp., 2009). W zdrowych tkankach tych narządów obecność ghreliny została wielokrotnie potwierdzana (Papotti i wsp., 2000, Gnanapavan i wsp., 2002, Ueberberg i wsp., 2009). W przypadku raka żołądka, przełyku, trzustki czy nerki nie udało się jednak wykazać ekspresji ghreliny (Duxbury

i wsp., 2003, Aydin i wsp., 2005, Mottershead i wsp., 2007, Dagli i wsp., 2009). Niska ekspresja ghreliny jako czynnika stymulującego proliferację lub wręcz jej brak może być zatem elementem mechanizmu ochronnego, przeciwdziałającego dalszemu wzrostowi guza.

Pośrednio o wpływie ghreliny na proliferację komórkową może świadczyć również zróżnicowanie ekspresji receptorów GHS-R. Obecność receptorów ghreliny na powierzchni komórek nowotworowych raka prostaty była dość zaskakującym odkryciem wobec ich braku w zdrowym gruczole (Papotti i wsp., 2000, Jeffery i wsp., 2002, Cassoni i wsp., 2004). Wynik ten był tym bardziej interesujący, że wykazanymi receptorami były uznawane za nieaktywne receptory GHS-R1b.

W porównaniu ze zdrowymi tkankami receptor GHS-R1b wykazywał silniejszą ekspresję także w gruczolakach przysadki (Korbonitis i wsp., 2001) i raku piersi (Jeffery i wsp., 2005). W raku jelita grubego ekpresja receptora GHSR-1b była również zdecydowanie silniejsza, przy osłabionej ekspresji receptora GHS-R1a lub wręcz jego zaniku (Waseem i wsp., 2008). Nie można zatem wykluczyć, że receptor GHS-R1b uczestniczy w przekazywania sygnału stymulujacego proliferację. Ponadto, wobec silnej ekspresji w nowotworach złośliwych różnych narządów może on stać się nowym markerem kancerogenezy.

Mechanizm, w jakim ghrelina stymuluje proliferację komórek nie został poznany. Prawdopodobnie jest on związany z kinazą białkową aktywowaną przez miogeny (MAPK, mitogen-activated protein kinase pathway), jak zaobserwowano w komórkach prostaty (Yeh i wsp., 2005), hepatocytach (Murata i wsp., 2002), kardiomiocytach (Baldanzi i wsp., 2002), adipocytach (Kim i wsp., 2004), komórkach kory nadnerczy (Andreis i wsp., 2003, Mazzocchi i wsp., 2004) i komórkach somatotropowych przysadki (Nanzer i wsp., 2004).

Ekspresja drugiego z peptydów – obestatyny w niniejszej pracy stwierdzana była najczęściej w tej samej lokalizacji, w której obserwowano odczyn dla ghreliny - głównie w komórkach okołopęcherzykowych, rzadziej w komórkach pęcherzykowych zdrowej tarczycy, wola guzowatego obojętnego i komórkach nowotworowych raka tarczycy. Niemniej jej immunoreaktywność

była słabsza i zróżnicowana w poszczególnych komórkach, także w komórkach nowotworowych.

Koekspresję ghreliny i obestatyny w tkance tarczycy wykazali także Karaoglu i wsp. (2009). Należy zaznaczyć, że autorzy nie odnotowali zróżnicowania intensywności odczynu obestatyny pomiędzy zdrową tarczycą, zapaleniem typu Hashimoto i rakiem brodawkowatym. Natomiast ekspresja ghreliny w raku brodawkowatym była znacznie słabsza niż w zdrowej tkance czy zapaleniu tarczycy typu Hashimoto. Stanowiłoby to niejako potwierdzenie dla teorii mówiącej o alternatywnej transkrypcji genu prepro-ghreliny i możliwości niezależnej syntezy ghreliny czy obestatyny. Również zespół Zhao (2008) zaobserwował, że w żołądku szczura komórki wykazujące ekspresję obestatyny są liczniejsze niż te wykazujące immunoreaktywność ghreliny. Możliwe są zatem różnice w ekspresji siostrzanych peptydów.

Volante i wsp. (2009) wykazali, że w guzach neuroendokrynnych intensywność odczynu dla obestatyny jest słabsza niż dla ghreliny. Niemniej jednak w guzach tarczycy ekspresja obestatyny była bardziej zaznaczona w porównaniu m.in. do nowotworów przewodu pokarmowego, gdzie obecność tego peptydu stwierdzano tylko w pojedynczych komórkach. Autorzy analizowali również wpływ obestatyny na proliferację komórek TT i BON-1 raka rdzeniastego tarczycy. Stężenie obestatyny produkowanej przez komórki BON-1 i TT było odpowiednio 10- i 2-krotnie wyższe niż stężenie stwierdzane w osoczu zdrowych ludzi. Po zahamowaniu ewentualnej aktywności obestatyny w komórkach BON-1 i TT poprzez ich inkubację w obecności przeciwciał antyobestatynowych nie wykazano żadnych zmian w zakresie wzrostu, różnicowania czy apoptozy tych komórek. Wskazywałoby to na brak autokrynowego działania obestatyny na komórki BON-1 i TT. Natomiast zastosowane ponadfizjologiczne stężenia obestatyny egzogennej wykazywały właściwości hamujące ich proliferację. Efekt ten był bardziej zaznaczony w obrębie komórek TT, co mogło wynikać z faktu, że komórki te produkują obestatynę w mniejszej ilości, mają słabiej rozwinięte ujemne sprzężenie zwrotne i przez to silniej na nią reagują (Volante i wsp., 2009).

Badanie Volante jest jedynym do tej pory badaniem mogącym wskazywać na antyproliferacyjne działanie obestatyny. Większość dotychczas opublikowanych prac wykazała, że obestatyna stymuluje proliferację różnych linii komórkowych - komórek siatkówki (Camina i wsp., 2007), komórek raka żołądka (Pazos i wsp., 2007), komórek β trzustki (Granata i wsp., 2008), komórek ziarnistych jajnika (Mészárosová i wsp., 2008), a także pre-adipocytów (Zhang i wsp., 2008). Wyniki te mają jednak charakter pojedynczych doniesień i wymagają szerszej analizy w kolejnych badaniach.

Niemniej jednak w związku z prawdopodobnym wpływem ghreliny na wzrost i różnicowanie komórek, koekspresja tkankowa ghreliny i obestatyny obserwowana w tarczycy skłania do rozważenia roli obestatyny jako czynnika mogącego wpływać na proliferację komórek tarczycy lub modulującego działanie ghreliny w tym zakresie.

6 PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Stężenie ghreliny w osoczu ulega zmianom w przebiegu zaburzeń czynności tarczycy.

   W nasilonej niedoczynności tarczycy w zapaleniu typu Hashimoto obserwuje się podwyższone stężenie ghreliny, które ulega spadkowi po leczeniu. U chorych po strumektomii totalnej z krótkotrwałą niedoczynnością tarczycy stężenie ghreliny osiąga wartości pośrednie pomiędzy wartościami obserwowanymi u osób zdrowych a hypotyreozą w przebiegu przewlekłego zapalenia tarczycy. W nadczynności tarczycy obserwowana jest tendencja do niskich stężeń ghreliny.
2. Zmiany stężenia ghreliny w niedoczynności i nadczynności tarczycy mogą stanowić element mechanizmu kompensującego zaburzenia równowagi energetycznej u tych chorych.
3. Pozytywna korelacja pomiędzy stężeniem ghreliny i obestatyny jest argumentem przeciwko teorii mówiącej o ich przeciwstawnych właściwościach. Współwystępowanie obu peptydów może wskazywać natomiast na ich wzajemną zależność. Nie można wykluczyć modulującej roli obestatyny w stosunku do działania ghreliny.
4. Ekspresję ghreliny wykazują komórki okołopęcherzykowe i pęcherzykowe zdrowej tarczycy, wola guzowatego oraz nowotworów złośliwych tarczycy. Obestatyna występuje w tej samej lokalizacji, co ghrelina, choć jej immunoreaktywność jest nierównomiernie nasilona i słabsza od odczynu ghreliny.
5. Koekspresja ghreliny i obestatyny w tarczycy potwierdza ich pochodzenie ze wspólnego prekursora – prepro - ghreliny. Natomiast zróżnicowanie ekspresji ghreliny i obestatyny w zakresie komórek pęcherzykowych i komórek C, a także różnice w nasileniu reakcji immunocytochemicznej pomiędzy komórkami zdrowymi i nowotworowymi może odzwierciedlać znaczenie funkcjonalne obu peptydów w tkance tarczycy.

7 PIŚMIENNICTWO

1. Akamizu T, Takaya K, Irako T, Hosoda H, Teramukai S, Matsuyama A, Tada H, Miura K, Shimizu A, Fukushima M, Yokode M, Tanaka K, Kangawa K. Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects, Eur J Endocrinol, 2004, 150(4): 447-455
2. Akamizu T, Shinomiya T, Irako T, Fukunaga M, Nakai Y, Nakai Y, Kangawa K, Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay, J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90: 6-9
3. al-Adsani H, Hoffer LJ, Silva JE, Resting energy expenditure is sensitive to small dose changes in patients on chronic thyroid hormone replacement, J Clin Endocrinol Metab, 1997, 82: 1118-1125
4. Altinova AE, Törüner FB, Aktürk M, Elbeğ S, Yetkin I, Cakir N, Arslan M, Reduced serum acylated ghrelin levels in patients with hyperthyroidism, Horm Res, 2006a, 65(6): 295-299
5. Altinova AE, Törüner FB, Karakoc A, Yetkin I, Ayvaz G, Cakir N, Arslan M, Serum ghrelin levels in patients with Hashimoto's thyroiditis, Thyroid 2006b, 16(12): 1259-1264
6. Anderwald-Stadler M, Krebs M, Promintzer M, Mandl M, Bischof MG, Nowotny P, Kästenbauer T, Luger A, Prager R, Anderwald C, Plasma obestatin is lower at fasting and not suppressed by insulin in insulin-resistant humans, Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007, 293: E1393-398
7. Andreis PG, Malendowicz LK, Trejter M, Neri G, Spinazzi R, Rossi GP, Nussdorfer GG, Ghrelin and growth hormone-secretagogue receptor are expressed in the rat adrenal cortex: evidence that ghrelin stimulates growth, but not secretory activity of adrenal cells, FEBS Lett, 2003, 536: 173-179
8. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K, Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans, J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86: 4753-4758
9. Arosio M, Ronchi CL, Gebbia C, Cappiello V, Beck-Peccoz P, Peracchi M, Stimulatory effects of ghrelin on circulating somatostatin and pancreatic polypeptide levels, J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88: 701-704

10. Arvat E, Di Vito L, Broglio F, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E, Preliminary evidence that ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. J Endocrinol Invest, 2000, 23: 493-495

11. Arvat E, Maccario M, Di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva FF, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E, Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone, J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86: 1169-1174

12. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Niijima A, Fujino MA, Kasuga M, Ghrelin is an appetite stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin, Gastroenterology, 2001, 120: 337-345

13. Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M, Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin, Gut, 2005, 54: 18-24

14. Aydin S, Ozercan IH, Dagli F, Aydin S, Dogru O, Celebi S, Akin O, Guzel SP. Ghrelin immunohistochemistry of gastric adenocarcinoma and mucoepidermoid carcinoma of salivary gland, Biotech Histochem, 2005, 80(3-4): 163-168

15. Bagnasco M, Kalra PS, Kalra SP, Ghrelin and leptin pulse discharge in fed and fasted rats, Endocrinology, 2002, 143: 726-729

16. Baiguera S, Conconi MT, Guidolin D, Mazzocchi G, Malendowicz LK, Parnigotto PP, Spinazzi R, Nussdorfer GG, Ghrelin inhibits in vitro angiogenic activity of rat brain microvascular endothelial cells, Int J Mol Med, 2004, 14(5): 849-854

17. Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonissoni S, Fubini A, Malan D, Baj G, Granata R, Broglio F, Papotti M, Surico N, Bussolino F, Isgaard J, Deghenghi R, Sinigaglia F, Prat M, Muccioli G, Ghigo E, Graziani A, Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT, J Cell Biol, 2002, 159(6): 1029-1037

18. Bang AS, Soule SG, Yandle TG, Richards AM, Pemberton CJ, Characterisation of proghrelin peptides in mammalian tissue and plasma, J Endocrinol, 2007, 192(2): 313-323

19. Barazzoni R, Bosutti A, Stebel M, Cattin MR, Roder E, Visintin L, Cattin L, Biolo G, Zanetti M, Guarnieri G, Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle, Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004, 288: E228-E235

20. Barazzoni R, Zanetti M, Ferreira C, Vinci P, Pirulli A, Mucci M, Dore F, Fonda M, Ciocchi B, Cattin L, Guarnieri G, Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome, J Clin Endocrinol Metab, 2007, 93: 3935-3940

21. Barreiro ML, Gaytan F, Castellano JM, Suominen JS, Roa M, Gaytan E, Aguilar E, Dieguez C, Toppari J, Tena-Sempere M, Ghrelin inhibits the proliterative activity of immnature Leydig cells in vivo and regulates stem cell factor messenger ribonucleic acid expression in rat testis, Endocrinology, 2004, 145: 4825-4834

22. Bassil AK, Häglund Y, Brown J, Rudholm T, Hellström PM, Näslund E, Lee K, Sanger GJ, Little or no ability of obestatin to interact with ghrelin or modify motility in the rat gastrointestinal tract, Br J Pharmacol, 2007, 150(1): 58-64

23. Beasley JM, Ange BA, Anderson CAM, Miller III ER, Holbrook JT, Appel LJ, Characteristics associated with fasting hormones (obestatin, ghrelin and leptin), Obesity, 2009, 17 (2): 349-354

24. Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM, Ramesh BS, Byrne DJ, MacColl GS, Keen JN, Bouloux PM, Mikhailidis DP, Bruckdorfer KR, Vanderpump MP, Srai KS, Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase, J Biol Chem, 2003, 278, 8877-8880

25. Bedendi I, Alloatti G, Marcantoni A, Malan D, Catapano F, Ghe C, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G, Cardiac effects of ghrelin and its endogenous derivatives des-octanoyl ghrelin and des-Gln 14-ghrelin, Eur J Pharmacol, 2003, 476: 87-95

26. Bergmann T, Lohmann T, Wallaschofski H, Association between thyroid function and ghrelin or adiponectin levels. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2003, 111: 395-396.

27. Bizzarri C, Rigamonti AE, Giannone G, Berardinelli R, Cella SG, Cappa M, Muller EE, Maintenance of a normal meal-induced decrease in plasma-ghrelin levels in children with Prader-Willi syndrome, Hormone Metabol Res, 2004, 36(3): 164-169

28. Blondeau JP, Beslin A, Chantoux F, Francon J, Triiodothyronine is a high-affinity inhibitor of amino acid transport system L1 in cultured astrocytes, J Neurochem, 1993, 60(4): 1407-1413

29. Braclik M, Marcisz C, Giebel S, Orzeł A, Serum leptin and ghrelin levels in premenopausal women with stable body mass index during treatment of thyroid dysfunction, Thyroid, 2008, 18(5): 545-550

30. Bresciani E, Rapetti D, Dona F, Bulgarelli I, Tamiazzo L, Locatelli V, Torsello A, Obestatin inhibits feeding but does not modulate GH and corticosterone secretion in the rat, J Endocrinol Invest, 2006, 29: RC 16-18

31. Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans, J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(10): 5083-5086

32. Broglio F, Koetsveld PP, Benso A, Gottero C, Prodam F, Papotti M, Muccioli G, Gauna C, Hofland L, Deghenghi R, Arvat E, Lely AJ, Ghigo E, Ghrelin secretion is inhibited by either somatostatin or cortistatin in humans, J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87: 4829-4832

33. Broglio F, Gottero C, Benso A, Prodam F, Destefanis S, Gauna C, Maccario M, Deghenghi R, van der Lely AJ, Ghigo E, Effects of ghrelin on the insulin and glycemic responses to glucose, arginine, or free fatty acids load in humans. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(9): 4268-4272

34. Broglio F, Van Gottero CKP, Prodam F, Destefanis S, Benso A, Gauna C, Hofland L, Arvat E, van der Lely AJ, Ghigo E, Acetylocholine regulates ghrelin secretion in humans, J Clin Endocrinol Metab, 2004: 89: 2429-2433

35. Brunetti L, Leone S, Orlando G, Recinella L, Ferrante C, Chiavaroli A, Di Nisio C, Di Michele P, Vacca M, Effects of obestatin on feeding and body weight after standard or cafeteria diet in the rat, Peptides, 2009, 30(7): 1323-1327

36. Brzozowski T, Konturek P, Konturek SJ, Kwiecień S, Drozdowicz D, Bielanski W, Pajdo W, Ptak A, Nikiforuk A, Pawlik WW, Hahn EG, Exogenous and endogenous ghrelin in gastroprotection against stress-induced gastric damage, Regul Pept, 2004, 120(1-3): 39-51

37. Brzozowski T, Konturek PC, Drozdowicz D, Konturek SJ, Pawlik M, Sliwowski Z, Pawlik WW, Hahn EG, Role of central and peripheral ghrelin in the mechanism of gastric mucosal defence, Immunopharmacology, 2005, 13: 45-62

38. Burdyga G, Varro A, Dimaline R, Thompson DG, Dockray GJ, Ghrelin receptors in rat and human nodose ganglia: putative role in regulating CB-1 and MCH receptor abundance; Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 290: G1289-G1297

39. Burggraaf J, Tulen JH, Lalezari S, Schoemaker RC, De Meyer PH, Meinders AE, Cohen AF, Pijl H, Sympathovagal imbalance in hyperthyroidism, Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001, 281: 190-195

40. Caixas A, Bashore C, Nash W, Pi-Sunyer F, Laferrere B, Insulin, unlike food intake, does not supress ghrelin in human subjects, J Clin Endocrinol Metab 2002, 87: 1902-1906

41. Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS, Breen PA, Matthys CC, Weigle DS, Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans, J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(3): 1319-1324

42. Camina JP, Campos JF, Caminos JE, Dieguez C, Casanueva FF, Obestatin-mediated proliferation of human retinal pigment epithelial cells: regulatory mechanisms, J Cell Physiol, 2007, 211: 1–9

43. Caminos JE, Seoane LM, Tovar SA, Casanueva FF, Dieguez C, Influence of thyroid status and growth hormone deficiency on ghrelin, Eur J Endocrinol, 2002, 147: 159-163

44. Carlini VP, Monzón ME, Varas MM, Cragnolini AB, Schiöth HB, Scimonelli TN, de Barioglio SR, Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats, Biochem Biophys Res Commun, 2002, 299: 739-743

45. Carlini VP, Varas MM, Cragnolini AB, Differential role of the hypocampus, amygdale, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin, Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(3): 635-641

46. Cassoni P, Papotti M, Catapano F, Ghe C, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G, Specific binding sites for synthetic growth hormone secretagogues in non-tumoral and neoplastic human thyroid tissue, J Endocrinol, 2000, 165: 139-146

47. Cassoni P, Papotti M, Ghè C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, Deghenghi R, Reissmann T, Ghigo E, Muccioli G, Identification, Characterization, and Biological Activity of Specific Receptors for Natural (Ghrelin) and Synthetic Growth Hormone Secretagogues and Analogs in Human Breast Carcinomas and Cell Lines, J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(4): 1738-1745

48. Cassoni P, Ghè C, Marrocco T, Tarabra E, Allia E, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Papotti M, Muccioli G, Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines, Eur J Endocrinol, 2004, 150(2): 173-184

49. Cassoni P, Allia E, Marrocco T, Ghe C, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M Ghrelin and cortistatin in lung cancer: expression of peptides and related receptors in human primary tumors and in vitro effect on the H345 small cell carcinoma cell line, J Endocrinol Invest, 2006, 29: 781–790

50. Chanoine JP, Wong AC, Ghrelin gene expression is markedly higher in fetal pancreas compared to fetal stomach: effect of maternal fasting. Endocrinology, 2004, 145: 3813-3820

51. Chartrel N, Alvear-Perez R, Leprince J, Iturrioz X, Reaux-Le Goazigo A, Audinot V, Chomarat P, Coge F, Nosjean O, Rodriguez M, Galizzi J P, Boutin JA, Vaudry H, Llorens-Cortes C, Comment on "Obestatin, a Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin's Effects on Food Intake" Science, 2007, 315(5813): 766

52. Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarth DT, Adams JR, Frazier EG, Shen Z, Marsh DJ, Feighner SD, Guan XM, Ye Z, Nargund RP, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, MacNeil DJ, Qian S, Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein, Endocrinology, 2004, 145: 2607-2612

53. Chen CY, Chao Y, Chang FY, Chien EJ, Lee SD, Doong ML, Intracisternal des-acyl ghrelin inhibits food intake and non-nutrient gastric emptying in conscious rats, Int J Mol Med, 2005, 16(4): 695-699

54. Cheng K, Chan WW, Barreto A Jr, Convey EM, Smith RG, The synergistic effects of His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH2 on growth hormone (GH)-releasing factor-stimulated GH release and intracellular adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in rat primary pituitary cell culture. Endocrinology, 1989, 124(6): 2791-2798

55. Choi KM, Lee J, Lee KW, Seo JA, Oh JH, Kim SG, Kim NH, Choi DS, Baik SH, The associations between plasma adiponectin, ghrelin levels and cardiovascular risk factors, Eur J Endocrinol, 2004: 150(5): 715-718

56. Conconi MT, Nico B, Guidolin D, Baiguera S, Spinazzi R, Rebuffat P, Malendowicz LK, Vacca A, Carraro G, Parnigotto PP, Nussdorfer GG, Ribatti D, Ghrelin inhibits FGF-2-mediated angiogenesis in vitro and in vivo, peptides 2004, 25: 2179-2185

57. Corbetta S, Peracchi M, Cappiello V, Lania A, Lauri E, Vago L, Beck-Peccoz P, Spada A, Circulating ghrelin levels in patients with pancreatic and gastrointestinal neuroendocrine tumors: identification of one pancreatic ghrelinoma. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(7): 3117-3120

58. Couce ME, Cottam D, Esplen J, Teijeiro R, Schauer P, Burguera B, Potential role of hypothalamic ghrelin in the pathogenesis of human obesity, J Endocrinol Invest, 2006, 29(7): 599-605

59. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL, The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a

novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis, Neuron, 2003, 37(4): 649-661

60. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS, A preprandial rise in plasma ghrelin suggests a role in meal initiation in human, Diabetes, 2001, 50: 1714-1719

61. Cummings DE, Clement K, Purnell JQ, Vaisse C, Foster KE, Frayo RS, Schwartz MW, Basdevant A, Weigle DS, Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome, Nat Med, 2002, 8: 643-644

62. Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, Aubert R, Chapelot D, Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues, Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004, 287(2): E297-304

63. Cummings DE, Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight, Physiol Behav, 2006, 89(1): 71-84

64. Dagli AF, Aydin S, Karaoglu A, Akpolat N, Ozercan IH, Ozercan MR. Ghrelin expression in normal kidney tissue and renal carcinomas, Pathol Res Pract, 2009, 205(3): 165-173

65. Date Y, Murakami N, Kojima M, Kuroiwa T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M, Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats, Biochem Biophys Res Commun, 2000a, 275: 477-480

66. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M, Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. Endocrinology, 2000b, 141: 4255-4261

67. 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: 904-907

68. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T, Matsukura S, Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion, Diabetes, 2002a, 51: 124-129

69. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Niijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M, The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats, Gastroenterology, 2002b, 123: 1120–1128

70. DelParigi A, Tschöp M, Heiman ML, Salbe AD, Vozarova B, Sell SM, Bunt JC, Tataranni PA, High circulating ghrelin: a potential cause of hyperphagia and obesity in Prader-Willi syndrome, J Clin Endocrinol Metabol, 2002, 87(12): 5461-5464

71. Depoortere I, Thijs T, Moechars D, De Smet B, Donck L Ver, Peeters TL, Effect of peripheral obestatin on food intake and gastric emptying in ghrelin – knockout mice, Br J Pharmacol, 2008, 153: 1550-1557

72. Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, Yada T, Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca2+ signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents, Diabetes, 2004, 53: 3142-3151

73. De Smet B, Thijs T, Peeters TL, Depoortere I, Effect of peripheral obestatin on gastric emptying and intestinal contractility in rodents, Neurogastroenterol Motil, 2007, 19: 211–217

74. De Vriese C, Gregoric F, Lema-Kisoka R, Waelbroeck M, Robberecht P, Delporte C, Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites, Endocrinology, 2004, 145: 4997-5005

75. De Vriese C, Gregoric F, De Neef P, Robberecht P, Delporte C, Ghrelin is produced by human erythroleukemic HEL cell line and involved in an autocrine pathway leading to cell proliferation, Endocrinology, 2005, 146: 1514-1522

76. De Vriese C, Hacquebard M, Gregoire F, Carpentier Y, Delporte C, Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins, Endocrinology, 2007, 148(5): 2355-2362

77. Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R, Lillard JW Jr, Taub DD, Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells, J Clin Invest, 2004, 114(1): 57-66

78. Dornonville de la Cour C, Lindström E, Norlén P, Håkanson R, Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells, Regul Pept, 2004, 120: 23-32

79. Duxbury MS, Waseem T, Ito H, Robinson MK, Zinner MJ, Ashley SW, Whag EE, Ghrelin promotes pancreatic adenocarcinoma cellular proliferation and invasiveness, Biochem Biophys Res Commun, 2003, 309: 464-468

80. Ebert EC, The thyroid and the gut, J Clin Gastroenterol, 2010, 44(6): 402-406

81. 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

82. Egido EM, Hernandez R, Marco J, Silvestre RA, Effect of obestatin on insulin, glucagon and somatostatin secretion in the perfused rat pancreas, Regul Pept, 2009, 152: 61-66

83. Erdmann J, Lippl F, Schusdziarra V, Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man, Regul Pept, 2003, 116: 101-107

84. Erdmann J, Topsch R, Lippl F, Gussmann P, Schusdziarra V, Postprandial response of plasma ghrelin levels to various test meals in relation to food intake, plasma insulin and glucose, J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89: 3048-3054

85. Fagerberg B, Hultén LM, Hulthe J, Plasma ghrelin, body fat, insulin resistance, and smoking in clinically healthy men: the atherosclerosis and insulin resistance study, Metabolism, 2003, 52(11):1460-1463

86. Fernández-Fernández R, Tena-Sempere M, Navarro VM, Barreiro ML, Castellano JM, Aguilar E, Pinilla L, Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies, Neuroendocrinology, 2005, 82: 245-255

87. Foster-Schubert KE, McTiernan A, Frayo RS, Schwartz RS, Rajan KB, Yasui Y, Tworoger SS, Cummings DE, Human plasma ghrelin levels increase during a one-year exercise program, J Clin Endocrinol Metab, 2004, 90(2): 820-825

88. Foster-Schubert KE, Overduin J, Prudom CE, Liu J, Callahan HS, Gaylinn BD, Thorner MO, Cummings DE, Acyl and total ghrelin are suppressed strongly by ingested proteins, weakly by lipids, and biphasically by carbohydrates, J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(5): 1971-1979

89. Freda PU, Reyes CM, Conwell IM, Sundeen RE, Wardlaw SL, Serum ghrelin levels in acromegaly: effects of surgical and long-acting octreotide therapy, J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88: 2037-2044

90. Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, Fukue Y, Tachibana T, Ishikawa H, Takeda S, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kangawa K, Nagata K, Kojima M, Ghrelin directly regulates bone formation, J Bone Min Res, 2005, 20: 790-798

91. Furnes MW, Stenstrom B, Tømmerås K, Skoglund T, Dickson SL, Kulseng B, Zhao CM, Chen D, Feeding behaviour In rats subjected to gastrectomy or gastric bypass burgery, Eur Surg Res, 2008, 40: 279-288

92. Garcia JM, Garcia-Touza M, Hijazi RA, Taffet G, Epner D, Mann D, Smith RG, Cunningham GR, Marcelli M, Active ghrelin levels and active to total ghrelin ratio in cancer-induced cachexia, J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90: 2920-2926

93. Gaspard T, Wondergem R, Hamamdzić M, Klitgaard HM, Serum somatomedin stimulation in thyroxine-treated hypophysectomized rats, Endocrinology, 1978, 102(2): 606-611

94. Gauna C, Delhanty PJD, Hofland LJ, Janssen JAMJL, Broglio F, Ross RJM, Ghigo E, van der Lely AJ, Ghrelin stimulates, while des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes, J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(2): 1055-1060

95. Germain N, Galusca B, Grouselle D, Frere D, Billard S, Epelbaum J, Estour B, Ghrelin and obestatin circadian levels differentiate bingeing-purging from restrictive anorexia nervosa, J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(6): 3057-3062

96. Ghelardoni S, Carnicelli V, Frascarelli S, Ronca-Testoni S, Zucchi R, Ghrelin tissue distribution: comparison between gene and protein expression, J Endocrinol Invest, 2006, 29: 115-121

97. Giménez-Palop O, Giménez-Pérez G, Mauricio D, Berlanga E, Potau N, Vilardell C, Arroyo J, González-Clemente JM, Caixàs A, Circulating ghrelin in thyroid dysfunction is related to insulin resistance and not to hunger, food intake or anthropometric changes, Eur J Endocrinol, 2005, 153(1): 73-79

98. Gjedde S, Vestergaard E, Gormsen LC, Riis ALD, Rungby J, Møller N, Weeke J, Jørgensen JOL, Serum ghrelin levels are increased in hypothyroid patients and become normalized by L-thyroxine treatment, J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(6): 2277-2280

99. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M, The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans, J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87: 2988-2991

100. Gourcerol G, Million M, Adelson DW, Wang Y, Wang L, Rivier J, St-Pierre DH, Taché Y, Lack of interaction between peripheral injection of CCK and obestatin in the regulation of gastric satiety signaling in rodents, Peptides, 2006, 27(11): 2811-2819

101. Gourcerol G, Coskun T, Craft LS, Mayer JP, Heiman ML, Wang L, Million M, St.-Pierre DH, Taché Y, Preproghrelin – derived peptide, obestatin, fails to influence food intake in lean and obese rodents, Obesity, 2007a, 15(11): 2643-2652

102. Gourcerol G, St-Pierre DH, Taché Y, Lack of obestatin effects on food intake – should obestatin be renamed ghrelin-associated peptide (GAP)?, Regul Pept, 2007b, 141(1-3): 1-7

103. Gourcerol G, Taché Y, Obestatin - a ghrelin-associated peptide that does not hold its promise to suppress food intake and motility, Neurogastroenterol Motil, 2007c, 19(3): 161-165. Erratum in: Neurogastroenterol Motil. 2007, 19(4): 327.

104. Granata R, Settanni F, Trovato L, Destefanis S, Gallo D, Martinetti M, Ghigo E, Muccioli G, Unacylated as well as acylated ghrelin promotes cell survival and inhibit apoptosis in HIT-T15 pancreatic beta-cells, J Endocrinol Invest, 2006, 29: RC19-22

105. Granata R, Settanni F, Gallo D, Trovato L, Biancone L, Cantaluppi V, Nano R, Annunziata M, Campiglia P, Arnoletti E, Ghè C, Volante M, Papotti M, Muccioli G, Ghigo E, Obestatin promotes survival of pancreatic beta-cells and human islets and induces expression of genes involved in the regulation of beta-cell mass and function, Diabetes, 2008, 57(4): 967 – 979

106. Green BD, Irwin N, Flaut PR, Direct and indirect effects of obestatin peptides on food intake and the regulation of glucose homeostasis and insulin secretion in mice, Peptides, 2007, 28(5): 981-987

107. Grönberg M, Tsolakis AV, Magnusson L, Janson ET, Saras J, Distribution of obestatin and ghrelin in human tissues: immunoreactive cells in the gastrointestinal tract, pancreas and mammary glands, J Histochem Cytochem, 2008, 56: 793-801

108. Gualillo O, Caminos J, Blanco M, Garcìa-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva F, Ghrelin, a novel placental-derived hormone, Endocrinology, 2001, 142(2): 788-794

109. Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues, Brain Res, 1997,48: 23-29

110. Guo ZF, Zheng X, Qin YW, Hu JQ, Chen SP, Hang Z, Circulating preprandial ghrelin to obestatin ratio is increased in human obesity, J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92: 1875–1880

111. Guo ZF, Ren AJ, Zheng X, Qin YW, Cheng F, Zhang J, Wu H, Yuan WJ, Zou L, Different responses of circulating ghrelin, obestatin levels to fasting, re-feeding and different food compositions, and their local expressions in rats, Peptides, 2008, 29(7):1247-1254

112. Haqq AM, Stadler DD, Jackson RH, Rosenfeld RG, Purnell JQ, LaFranchi SH, Effects of growth hormone on pulmonary function, sleep quality, behavior, cognition, growth velocity, body composition, and resting energy expenditure in Prader-Willi syndrome, J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88: 2206-2212

113. Harada T, Nakahara T, Yasuhara D, Kojima S, Sagiyama K, Amitani H, Naruo A, Inui A, Obestatin, acyl ghrelin and des-acyl ghrelin responses to an oral glucose tolerance test in the restricting type of anorexia nervosa, Biol Psychiatry, 2008, 63: 245-247

114. Hataya Y, Akamizu T, Takaya K, Kanamoto N, Ariyasu H, Saijo M, Moriyama K, Shimatsu A, Kojima M, Kangawa K, Nakao K, A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans, J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86: 4552-4555

115. 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): 4284-4291.

116. Herwig A, Ross AW, Nilaweera KN, Morgan PJ, Barrett P, Hypothalamic thyroid hormone in energy balance regulation, Obes Facts, 2008, 1(2): 71-79

117. Hewson AK, Dickson SL, Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats, J Neuroendocrinol, 2000, 12 (11): 1047–1049

118. Heijboer AC, van den Hoek AM, Parlevliet ET, Havekes LM, Romijn JA, Pijl H, Corssmit EP, Ghrelin differentially affects hepatic and peripheral insulin sensitivity in mice, Diabetologia, 2006, 49: 732-738

119. Holder AT, Wallis M, Biggs P, Preece MA, Effects of growth hormone, prolactin and thyroxine on body wegith, somatomedin-like activity and in vivo sulphation of cartilage in hypopituitary dwarf mice, J Endocrinol, 1980, 85(1): 35-41.

120. Holst B, Egerod KL, Schild E, Vickers SP, Cheetham S, Gerlach LO, Storjohann L, Stidsen CE, Jones R, Beck-Sickinger AG, Schwartz TW, GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin, Endocrinology, 2007, 148: 13-20

121. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Purification and characterisation of rat des-Gln^{14}-ghrelin, a secondo endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor, J Biol Chem, 2000, 275: 21995-22000

122. 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: 64-70

123. Hosoda H, Doi K, Nagaya N, Okumura H, Nakagawa E, Enomoto M, Ono F, Kangawa K, Optimum collection and storage conditions for ghrelin measurements; octanoyl modification of ghrelin is rapidly hydrolyzed to desacyl ghrelin in blood samples, Clin Chem, 2004, 50: 1077-1080

124. Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin, J Pharmacol Sci, 2006, 100(5): 398-410

125. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberator PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevicz M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Patrick RG, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH, A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release, Science, 1996, 273: 974-977

126. Hsu SM, Raine L, Fanger H, Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures, J Histochem Cytochem, 1981, 29(4): 577-580

127. Huda MS, Durham BH, Wong SP, Deepak D, Kerrigan D, McCulloch P Ranganath L, Pinkney J, Wilding JP, Plasma obestatin levels are lower in obese and post-gastrectomy subjects, but do not change in response to a meal, Int J Obes (Lond), 2008, 32(1): 129-35

128. Iglesias P, Diez JJ, Thyroid dysfunction and kidney disease, Eur J Endocrinol, 2009, 160: 503-515

129. Inui A, Cancer anorexia-cachexia syndrome: are neuropeptides the key? Cancer Res, 1999, 59: 4493-4501

130. Inui A. Ghrelin: an orexigenic and somatothropic signal from the stomach, Nature Reviews, Neuroscience, 2001, 2:551-560

131. Iranmanesh A, Lizarralde G, Jognson ML, Veldhuis JD, Nature of altered growth hormone secretion in hyperthyroidism, J Clin Endocrinol Metab, 1991, 72: 108-115

132. Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S. Hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway activated by a reduction in circulating leptin, but not by an increase in circulating ghrelin, contributes to hyperphagia associated with triiodothyronine-induced thyrotoxicosis, Neuroendocrinology, 2003, 78(6): 321-330

133. Iwakura H, Hosoda K, Doi R, Komoto I, Nishimura H, Son C, Fujikura J, Tomita T, Takaya K, Ogawa Y, Hayashi T, Inoue G, Akamizu T, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Imamura M, Nakao K, Ghrelin expression in islet cell tumors: augmented expression of ghrelin in a case of glucagonoma with multiple endocrine neoplasm type I, J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(11): 4885-4888

134. Jeffery PL, Herington AC, Chopin LK, Expression and action of the growth hormone-releasing peptide ghrelin and its receptor in prostate cancer cell lines, J Endocrinol 2002, 172: R7-11

135. Jeffery PL, Murray RE, Yeh AH, McNamara JF, Duncan RP, Francis GD, Herington AC, Chopin LK, Expression and function of the ghrelin axis, including a novel preproghrelin isoform, in human breast cancer tissues and cell lines, Endocr Relat Cancer, 2005, 12(4): 839-850

136. Kakidani H, Furutani Y, Takahashi H, Noda M, Morimoto Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Nakanishi S, Numa S, Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor, Nature, 1982, 298(5871): 245-249

137. Kamegai J, Tamura H, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I, Thyroid hormones regulate pituitary growth hormone secretagogue receptor gene expression, J Neuroendocrinol, 2001, 13: 275-278

138. Kanamoto N, Akamizu T, Hosoda H, Hataya Y, Ariyasu H, Takaya K, Hosoda K, Saijo M, Moriyama K, Shimatsu A, Kojima M, Kangawa K, Nakao K, Substantial production of ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line, J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86: 4984-4990

139. Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K, Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene, Endocrinology, 2004; 145(9): 4144 – 4153

140. Karaoglu A, Aydin S, Dagli AF, Cummings DE, Ozercan IH, Canatan H, Ozkan Y, Expression of obestatin and ghrelin in papillary thyroid carcinoma, Mol Cell Biochem, 2009, 323(1-2): 113-118

141. Karasik A, Rothenberg PL, Yamada K, White MF, Kahn C, Increased protein kinase C activity is linked to reduced insulin receptor autophosforylation in liver of starved rats, J Biol Chem, 1990, 265: 10226-10231

142. Katsuki A, Urakawa H, Gabazza EC, Murashima S, Nakatani K, Togashi K, Yano Y, Adach Y, Sumida Y, Circulating levels of active ghrelin is accociated with abdominal adiposity, hyperinsulinaemia and ghrelin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus, Eur J Endocrinol, 2004, 151: 573-577

143. Kim K, Arai K, Sanno N, Osamura RY, Teramoto A, Shibasaki T, Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor (GHSR) mRNA expression in human pituitary adenomas, Clin Endocrinol, 2001, 54: 759-768

144. Kim MS, Yoon CY, Jang PG, Park HS, Ryu JW, Park YJ, Shin CS, Park JY, Lee KU, Kim YB, Kim SY, Lee HK, Park KS, The mitogenic and anti-apoptotic actions of ghrelin in 3T3–L1 adipocytes, Mol Endocrinol, 2004, 18: 2291-2301

145. Kim S, Lee JH, Heo JS, Kwak MJ, Kim SJ, Sohn YB, Kim SE, Song SY, Choe YH, Baek JW, Rha MY, Oh YJ, Jin DK, Serum obestatin/ghrelin ratio is altered in patients after distal gastrectomy, Dig Surg, 2009, 26(2): 143-148

146. Klein I, Danzi S, Thyroid disease and the heart, Circulation, 2007, 116(15): 1725-1735, Erratum in: Circulation. 2008, 117(3): e18.

147. Klieverik LP, Sauerwein HP, Ackermans MT, Boelen A, Kalsbeek A, Fliers E, Effects of thyrotoxicosis and selective hepatic autonomic denervation on hepatic glucose metabolism in rats, Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008, 294(3): E513-520

148. Klieverik LP, Coomans CP, Endert E, Sauerwein HP, Havekes LM, Voshol PJ, Rensen PCN, Romijn JA, Kalsbeek A, Fliers E, Thyroid hormone effects on whole-body energy homeostasis and tissue specific fatty acid uptake in vivo, Thyroid, 2009, 150(12): 5639-5648

149. Kluge M, Riedl S, Uhr M, Schmidt D, Zhang X, Yassouridis A, Steiger A, Ghrelin affects the hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis in humans by increasing free thyroxinr (fT4) and decreasing TSH in plasma, Eur J Endocrinol, 2010, 162(6): 1059-1065

150. Kojima M, Hosoda AH, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K, Ghrelin is a growth hormone releasing acylated peptide from stomach, Nature, 1999, 402: 656-660

151. Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K, Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor, Trends Endocrinol Metab, 2001, 12: 118-122

152. Kojima M, Kangawa K, Ghrelin, an orexigenic signalling molecule from gastrointestinal tract, Curr Opin Pharmacol, 2002, 2: 665-668

153. Kong WM, Martin NM, Smith KL, Gardiner JV, Connoley IP, Stephens DA, Dhillo WS, Ghatei MA, Small CJ, Bloom SR. Triiodothyronine stimulates food intake via the hypothalamic ventromedial nucleus independent of changes in energy expenditure, Endocrinology, 2004, 145(11): 5252-5258

154. Koo GC, Huang C, Camacho R, Trainor C, Blake JT, Sirotina-Meisher A, Schleim KD, Wu TJ, Cheng K, Nargund R, McKissick G, Immune enhancing effect of a growth hormone secretagogue, J Immunol, 2001, 166(6): 4195-201

155. Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, Kangawa K, Grossman AB, The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand

ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors, J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(2): 881-887

156. Kosowicz J, Baumann-Antczak A, Ruchała M, Gryczyńska M, Gurgul E, Sowiński J. Thyroid hormones affect plasma ghrelin and obestatin levels, Horm Metab Res [Epub 2010 Dec 16]
157. Lagaud GJ, Young A, Acena A, Morton MF, Barrett TD, Shankley NP, Obestatin reduces food intake and suppresses body weight gain in rodents Biophys Res Commun, 2007, 357: 264–269
158. Lanfranco F, Bonelli L, Broglio F, Me E, Baldi M, di Bisceglie C, Tagliabue, Manieri C, Ghigo E, Ghrelin inhibits LH pulsatility in humans, (ENDO2006), 88th Endocrine Society Meeting Boston 2006, P3-807
159. Laron Z, Interactions between the thyroid hormones and the hormones of the growth hormone axis, Pediatr Endocrinol Rev, 2003, 1 Suppl, 2: 244-250
160. Lauwers E, Landuyt B, Arckens L, Schoofs L, Luyten W, Obestatin does not activate orphan G protein-coupled receptor GPR39, Biochem Biophys Res Commun, 2006, 351: 21-25
161. Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM, Luckman SM, Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers, Endocrinology, 2002, 143: 155–162
162. Lee WM, Diaz-Espineira M, Mol JA, Rijnberk A, Primary hypothyroidism in dogs is associated with elevated GH release, J Endocrinol, 2001, 168: 59-66
163. Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH Jr, Ghrelin: a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion – enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine and dietetary manipulations, Endocrinology, 2002, 143: 185-190
164. Leibowitz SF, Brain monoamines and peptides: role in the control of eating behavior, Fed Proc, 1986, 45(5): 1396-403
165. Leite-Moreira AF, Soares JB, Physiological, pathological and potential therapeutic roles of ghrelin, Drug Discov Today, 2007, 12: 276–288
166. Li WG, Gavrila D, Liu X, Wang L, Gunnlaugsson S, Stoll LL, McCormick ML, Sigmund CD, Tang C, Weintraub NL, Ghrelin inhibits proinflammatory responces and nuclear factor-kappa B activation in human endothelial cells, Circulation, 2004, 109: 2221-2226

167. Lippl F, Erdmann J, Lichter N, Tholl S, Wagenpfeil S, Adam O, Schusdziarra V, Relation of plasma obestatin levels to BMI, gender, age and insulin, Horm Metab Res, 2008, 40 (11): 806-812

168. López M, Seoane L, Tovar S, Señarís RM, Diéguez C, Thyroid status regulates CART but not AgRP mRNA levels in the rat hypothalamus, Neuroreport, 2002, 13(14): 1775-1779.

169. Lucidi P, Murdolo G, Di Loreto C, De Cicco A, Parlanti N, Fanelli C, Santeusanio F, Bolli GB, De Feo P, Ghrelin is not necessary for adequate hormonal counterregulation of insulin-induced hypoglycemia, Diabetes, 2002, 51(10): 2911-2914

170. Maccarinelli G, Sibilia V, Torsello A, Raimondo F, Pitto M, Giustina A, Netti C, Cocchi D, Ghrelin regulates proliferation and differentiation of osteoblastic cells, J Endocrinol, 2005, 184: 249-256

171. Magnus-Levy A. Ueber den respiratorischen Gaswechsel unter Einfluss de Thyroidea sowie unter verschiedenen pathologische Zustand, Berlin Klin Wochschr, 1895, 32: 650-652

172. Mains RE, Eipper BA, Glembotski CC, Dores RM, Strategies for the biosynthesis of bioactive peptides, Trends Neurosci, 1983, 6: 229−235

173. Malagón MM, Luque RM, Ruiz-Guerrero E, Rodríguez-Pacheco F, García-Navarro S, Casanueva FF, Gracia-Navarro F, Castaño JP, Intracellular Signaling Mechanisms Mediating Ghrelin-Stimulated Growth Hormone Release in Somatotropes, Endocrinology, 2003, 144(12): 5372-5380

174. Malendowicz W, Ziolkowska A, Szyszka M, Kwias Z. Elevated blood active ghrelin and unaltered total ghrelin and obestatin concentrations in prostate carcinoma, Urol Int, 2009, 83(4): 471-475

175. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats, Biochem Biophy Res Commun, 2000, 276: 905-908

176. Matsuda K, Miura T, Kaiya H, Maruyama K, Shimakura S, Uchiyama M, Kangawa K, Shioda S, Regulation of food intake by acyl and des acyl ghrelins in the goldfish, Peptides, 2006, 27: 2321-2325

177. Mazzocchi G, Neri G, Rucinski M, Rebuffat P, Spinazzi R, Malendowicz LK, Nussdorfer GG, Ghrelin enhances the growth of human adrenal zona glomerulosa cells by exerting MAPK-mediated proliferogenic and antiapoptotic effects, Peptides, 2004, 25: 1269-1277

178. McCowen KC, Maykel JA, Bistrian BR, Ling PR, Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinaemic euglycaemic conditions in rodents, J Endocrinol, 2002, 175: R7-R11

179. McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS, Cummings DE, Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls, J Clin Endocrinol Metab. 2004, 89(4):1630-1635

180. McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors, Mol Endocrinol, 1997, 11: 415-423

181. Méndez-Sánchez N, Chávez-Tapia NC, Uribe-Esquivel M, Ghrelin and the gastro-hypothalamic axis, Gac Med Mex, 2006, 142(1): 49-58

182. Mészárosová M, Sirotkin AV, Grossmann R, Darlak K Valenzuela F, The effect of obestatin on porcine ovarian granulosa cells, Anim Reprod Sci, 2008, 108(1-2): 196-207

183. Miell JP, Taylor AM, Zini M, Hiralal GM, Ross RJM, Valcavi R, Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on insulin-like growth factors (IGFs) and growth hormone- and IGF-binding proteins, J Clin Endocrinol Metab, 1993, 76: 950-955

184. Mohlig M, Springer J, Otto B, Ristow M, Tschop M, Pfeiffer AF, Euglycaemic hyperinsulinaemia, but not lipid infusion, decreases circulating ghrelin levels in humans. J Endocrinol Invest 2002, 25: RC36-38

185. Monteleone P, Bencivenga R, Longobardi N, Serritella C, Maj M, Differential responces of circulating ghrelin to high-fat or high-carbohydrate meal in healthy women, J Clin Endocrinol Metab 2003, 88: 5510-5514

186. Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, Hosoda K, Ariyasu H, Yahata K, Mukoyama M, Sugawara A, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin, EBS Lett, 2000, 486(3): 213-216

187. Morovat A and Dauncey MJ, Effects of thyroid status on insulin-like growth factor-I, growth hormone and insulin are modified by food intake, Eur J Endocrinol, 1998, 138: 95-103

188. Morpurgo PS, Cappiello V, Verga U, Vicentini L, Vaghi I, Lauri E, Nebuloni M, Beck-Peccoz P, Spada A, Ghrelin in human medullary carcinomas, Clin Endocrinol, 2005, 63: 437-441

189. Moshang T Jr, Parks JS, Baker L, Vaidya V, Utiger RD, Bongiovanni AM, Snyder PJ, Low serum triiodothyronine in patients with anorexia nervosa, Clin Endocrinol Metab, 1975, 40(3): 470-473

190. Mottershead M, Karteris E, Barclay JY, Suortamo S, Newbold M, Randeva H, Nwokolo CU. Immunohistochemical and quantitative mRNA assessment of ghrelin expression in gastric and oesophageal adenocarcinoma, J Clin Pathol, 2007, 60(4): 405-409

191. Muccioli G, Pons N, Ghe` C, Catapano F, Granata R, Ghigo E, Ghrelin and des-acyl ghrelin both inhibit isoproterenol-induced lipolysis in rat adipocytes via a non-type 1a growth hormone secretagogue receptor, Eur J Pharmacol, 2004, 498: 27-35

192. Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K, Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells, J Biol Chem, 2002, 277: 5667-5674

193. Nagaraj S, Peddha MS, Manjappara UV, Fragments of obestatin as modulators of food intake, circulating lipids and stored fat, Biochem Biophys Res Commun, 2008, 366: 731-737

194. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Ikeda Y, Yoshihara F, Shimizu W, Hosoda H, Hirota Y, Ishida H, Mori H, Kangawa K, Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure, Circulation, 2001, 104: 1430-1435

195. Nakagawa E, Nagaya N, Okumura H, Enomoto M, Oya H, Ono F, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Hyperglycaemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth-hormone-releasing-peptide: response to the intravenous and oral administration of glucose, Clin Sci (Lond), 2002, 103: 325-328

196. Nakahara T, Harada T, Yasuhara D, Shimada N, Amitani H, Sakoguchi T, Kamiji MM, Asakawa A, Inui A, Plasma obestatin concentrations are negatively correlated with body mass index, insulin resistance index, and plasma leptin concentrations in obesity and anorexia nervosa, Biol Psychiatry, 2008, 64(3): 252-255

197. Nakai N, Kaneko M, Nakao N, Fujikawa T, Nakashima K, Ogata M, Tanaka M, Identification of promoter region of ghrelin gene in human medullary thyroid carcinoma cell line, Life Sci, 2004, 75: 2193-2201

198. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S, A role for ghrelin in the central regulation of feeding, Nature, 2001, 409: 194–198

199. Nanzer AM, Kahlaf S, Mozid AM, Fowkes RC, Patel MV, Burrin JM, Grossman AB, Korbonitis M, Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway, Eur J Endocrinol, 2004, 151: 233-240

200. Nascif SO, Correa-Silva SR, Silva MR, Lengyel AMJ, Decreased ghrelin-induced GH release in thyrotoxicosis: comparison with GH-releasing peptide-6 (GHRP-6) and GHRH, Pituitary, 2007, 10: 27-33

201. Nauman A, Piekiełko-Witkowska A, Turowska O, Popławski P, Master A, Tański Z, Lampkowska J, Wójcicka A, Brózda I, Puzianowska-Kuźnicka M, Zaburzenia szlaków sygnałowych hormonu tarczycy – trijodotyroniny – w raku nerki typu jasnokomórkowego, Postępy Nauk Medycznych, 2008, 5: 268-278

202. Näntö-Salonen K, Muller HL, Hoffman AR, Vu TH, Rosenfeld RG, Mechanisms of thyroid hormone action on the insulin-like growth factor system: all thyroid hormone effects are not growth hormone mediated, Endocrinology, 1993, 132(2): 781-788

203. Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H, Kaiya H, Mori K, Fukue Y, Yanase T, Nawata H, Kangawa K, Kojima M, Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl-modification of ghrelin, Endocrinology 2005, 146: 2255-2264

204. Noda M, Furutani Y, Takahashi H, Toyosato M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S, Numa S, Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin, Nature, 1982, 295(5846): 202-206

205. Nogueiras R, Pfluger P, Tovar S, Arnold M, Mitchell S, Morris A, Perez-Tilve D, Vázquez MJ, Wiedmer P, Castañeda TR, DiMarchi R, Tschöp M, Schurmann A, Joost HG, Williams LM, Langhans W, Diéguez C, Effects of Obestatin on Energy Balance and Growth Hormone Secretion in Rodents, Endocrinology, 2007, 148(1): 21-26

206. Norrelund H, Hansen TK, Ørskov H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Weeke J, Møller N, Christiansen JS, Jørgensen JO, Ghrelin immunoreactivity in human plasma is suppressed by somatostatin, Clin Endocrinol, 2002, 4: 539-546

207. Ott V, Fasshauer M, Dalski A, Meier B, Perwitz N, Klein HH, Tschop M, Klein J, Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression, Horm Metab Res, 2002, 34: 640-645

208. Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M, Tschop M, Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa, Eur J Endocrinol, 2001, 145: 669-673

209. Overduin J, Frayo RS, Grill HJ, Kaplan JM, Cummings DE, Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation, Endocrinology, 2005, 146(2): 845-850

210. Paez X, Leibowitz SF. Changes in extracellular PVN monoamines and macronutrient intake after idazoxan or fluoxetine injection, Pharmacol Biochem Behav, 1993, 46(4): 933-941

211. Pan W, Tu H, Kasin AJ, Differential BBB interactions of three ingestive peptides: obestatin, ghrelin and adiponectin, Peptides, 2006, 27: 911-916

212. Papotti M, Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G, Growth hormone secretagog binding sites in peripheral human tissues, J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(10): 3803-3807

213. Papotti M, Cassoni P, Volante M, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E, Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine, J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(10): 5052-5059

214. Park JM, Kakimoto T, Kuroki T, Shiraishi R, Fujise T, Iwakiri R, Fujimoto K, Supression of intestinal mucosal apoptosis by ghrelin in fasting rats, Exp Biol Med (Maywood), 2008, 233: 148-156

215. Patel AD, Stanley SA, Murphy KG, Frost GS, Gardiner JV, Kent AS, White NE, Ghatei MA, Bloom SR, Ghrelin stimulates insulin-induced glucose uptake in adipocytes, Regul Pept, 2006, 134: 17-22

216. Pazos Y, Alvarez CJ, Camiña JP, Casanueva FF, Stimulation of extracellular signal-regulated kinases and proliferation in the human gastric cancer cells KATO-III by obestatin, Growth Factors, 2007, 25: 373-381

217. Pazos Y, Álvarez CJP, Camiña JP, Al-Massadi O, Seoane LM, Casanueva FF, Role of obestatin on growth hormone secretion: An in vitro approach, Biochem Biophys Res Commun, 2009, 390: 1377-1381

218. Pénicaud L, Leloup C, Fioramonti X, Lorsignol A, Benani A, Brain glucose sensing: a subtle mechanism, Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006, 9(4): 458-462

219. Peracchi M, Conte D, Terrani C, Pizzinelli S, Gebbia C, Cappiello V, Spada A, Bardella MT, Circulating ghrelin levels in celiac patients, Am J Gastroenterol, 2003, 98(11): 2474-2478

220. Pérez-Fontán M, Cordido F, Rodríguez-Carmona A, Peteiro J, García-Naveiro R, García-Buela J, Plasma ghrelin levels in patients undergoing haemodialysis and peritoneal dialysis, Nephrol Dial Transplant, 2004, 19(8): 2095-2100

221. Persson H, Bennegård K, Lundberg PA, Svaninger G, Lundholm K, Thyroid hormones in conditions of chronic malnutrition. A study with special reference to cancer cachexia, Ann Surg, 201(1): 45-52

222. Petersenn S, Rasch AC, Penshorn M, Beil FU, Schulte HM, Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor, Endocrinology, 2001, 142: 2649-2659

223. Pijl H, Koppeschaar HPF, Willekens FLA, Op de Kamp I, Veldhuis HD, Meinders AE, Effect of serotonine re-uptake inhibition by fluoxetine on body weight and spontaneous food choice in obesity, Int J Obesity, 1991, 15: 237-242

224. Pijl H, De Meijer PHEM, J LAngius J, Coenegracht CIGM, Van der Berk AHM, Chandie Shaw PK, Boom H, Schoemaker RC, Cohen AF, Burgraaf J, Meinders AE, Food choice in hyperthyroidism: Potential influence of the autonomic nervous system and brain serotonin precursor availability, J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(12): 5848-5853

225. Pillay TS, Whittaker J, Siddle K, Phorbol ester-induced down-regulation of protein kinase C potentiates insulin receptor thyrosine autophosforylation: evidence for a major constitutive role in insulin receptor regulation, Biochem Soc Trans, 1990, 18: 494-495

226. Popovic V, Miljic D, Micic D, Damjanovic S, Arvat E, Ghigo E, Dieguez C, Casanueva FF, Ghrelin Main Action on the Regulation of Growth Hormone Release Is Exerted at Hypothalamic Level, J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(7): 3450-3453

227. Prado CL, Puch Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussex L, Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development, Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 2924-2929

228. Purnell JQ, Weigle DS, Breen P, Cummings DE. Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, and high-density lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans, J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(12): 5747-5752

229. Qader SS, Håkanson R, Rehfeld JF, Lundquist I, Salehi A, Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: A study on isolated islets from mouse and rat pancreas, Regul Pept, 2007, 146: 230-237

230. Qi X, Li L, Yang G, Liu J, Li K, Tang Y, Liou H, Boden G, Circulating obestatin levels in normal subjects and in patients with impaired glucose regulation and type 2 diabetes mellitus, Clin Endocrinol (Oxf), 2007, 66(4): 593-597

231. Raghay K, Garcia-Caballero T, Nogueiras R, Morel G, Beiras A, Dieguez C, Gallego R, Ghrelin localization in rat and human thyroid and parathyroid glands and tumors, Histochem Cell Biol, 2006, 89: 400-409

232. Reimer MK, Pacini G, Ahrén B, Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse, Endocrinology, 2003, 144: 916-921

233. Ren AJ, Guo ZF, Wang YK, Wang LG, Wang WZ, Lin L, Zheng X, Yuan WJ, Inhibitory effect of obestatin on glucose-induced insulin secretion in rats, Biochem Biophys Res Commun, 2008, 369: 969-972

234. Riis AL, Hansen TK, Moller N, Weeke J, Jorgensen JE, Hyperthyroidism is associated with suppressed circulating ghrelin level, J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88: 853-857

235. Rojdmark S, Calissendorff J, Danielsson O, Brismar K, Hunger-satiety signals in patients with Graves' thyrotoxicosis before, during, and after long-term pharmacological treatment, Endocrine, 2005, 27: 55-61

236. Ruchała M, Ghrelina i somatostatyna jako modulatory sekrecji hormonów tarczycy: badania doświadczalne in vivo i in vitro oraz wynikające z nich implikacje kliniczne, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. K. Marcinkowskiego, Poznań, 2007

237. Saad MF, Bernaba B, Hwu CM, Jinagouda S, Fahmi S, Kogosov E, Boyadjian R, Insulin regulates plasma ghrelin concentration, J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87: 3997-4000

238. Sadegholvad A, Afkhamizadeh M, Ranjbar-Omrani G, Serum ghrelin changes in thyroid dysfunction, Arch Iran Med, 2007, 10(2): 168-170

239. Salehi A, Dornonville de la Cour C, Håkanson R, Lundquist I, Effects of ghrelin on insulin and ghrelin secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice, Regul Pept, 2004, 118: 143-150

240. Samson WK, White MM, Price C, Ferguson AV, Obestatin acts in brain to inhibit thirst, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 292(1): R637-643

241. Scacchi M, Pincelli AI, Cavagnini F, Nutritional status in the neuroendocrine control of growth hormone secretion: the model of anorexia nervosa, Front Neuroendocrinol, 2003, 24: 200-224

242. Schaller G, Schmidt A, Pleiner J, Wołoszczuk W, Wolzt M, Luger A, Plasma ghrelin concentrations are not regulated by glucose or insulin: a double blind, placebo controlled crossover clamp study, Diabetes, 2003, 52: 16-20

243. Seim I, Collet C, Herington AC, Chopin LK, Revised genomic structure of the human ghrelin gene and identification of novel exons, alternative splice variants and natural antisense transcripts, BMC Genomics, 2007, 8: 298

244. Seim I, Amorim L, Walpole C, Carter S, Chopin LK, Herington AC, Ghrelin gene-related peptides: multifunctional endocrine / autocrine modulators in health and disease, Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37(1): 125-131

245. Seoane LM, Al-Massadi O, Pazos Y, Pagotto U, Casanueva FF, Central obestatin administration does not modify either spontaneous or ghrelin-induced food intake in rats, J Endocrinol Invest, 2006, 29: RC13–15

246. Sestoft L, Metabolic aspects of the calorigenic effect of thyroid hormone in mammals, Clin Ednocrinol (Oxf), 1980, 13: 489-506

247. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S, Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion, J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87: 240-244

248. Shimizu Y, Chang EC, Shafton AD, Ferens DM, Sanger GJ, Witherington J, Furness JB, Evidence that stimulation of ghrelin receptors in the spinal cord initiates propulsive activity in the colon of the rat, J. Physiol 2006, 576: 329-338

249. Shor-Posner G, Grinker JA, Marinescu C, Brown O, Leibowitz SF, Hypothalamic serotonin in the control of meal patterns and macronutrient selection, Brain Res Bull, 1986, 17: 663-671

250. Sibilia V, Bresciani E, Lattuada N, Rapetti D, Locatelli V, De Luca V, Donà F, Intracerebroventricular acute and chronic administration of obestatin minimally affect food intake but not weight gain in the rat, J Endocrinol Invest 2006, 29(11): RC31-4

251. Smith RG, Palyha OC, Feighner SD, Tan CP, McKee KK, Hreniuk DL, Yang L, Morriello G, Nargund R, Patchett AA, Howard AD, Growth hormone releasing substances: types and their receptors, Horm Res, 1999, 51(3): 1-8

252. Soares JB, Leite-Moreira AF: Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: Three pieces of the same puzzle, Peptides, 2008, 29: 1255-1270

253. Soriano-Guillén L, Barrios V, Campos-Barros A, Argente J, Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation, J Pediatr, 2004, 144: 36-42

254. Soule SG, Yandle TG, Richards AM, Pemberton CJ, Characterisation of proghrelin peptides in mammalian tissue and plasma, J Endocrinol, 2007, 192: 313-323

255. St-Pierre DH, Settani F, Olivetti I, Gramaglia E, Tomelini M, Granata R, Prodam F, Benso A, Ghigo E, Broglio F, Circulating obestatin levels in normal and type 2 diabetic patients, J Endocrinol Invest, 2010, 33 (4): 211-214

256. Subasinghage AP, Green BD, Flatt PR, Irwin N, Hewage CM, Metabolic and structural properties of human obestatin {1-23} and two fragment peptides, Peptides, 2010, 31(9): 1697-1705

257. Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Verbeke K, Janssens J, Peeters T, Influence of ghrelin on gastric emptying and meal-related symptoms in idiopathic gastroparesis, Aliment Pharmacol Ther, 2005, 22(9): 847-853

258. Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Delporte C, Coulie B, Meulemans A, Janssens J, Peeters T, Influence of ghrelin on interdigestive gastrointestinal motility in man, Gut, 2006, 55(3): 327-333

259. Tacke F, Brabant G, Kruck E, Horn R, Schöffski P, Hecker H, Manns MP, Trautwein C, Ghrelin in chronic liver disease, J Hepatol, 2003, 38: 447-454

260. Takahashi Y, Kato K, Hayashizaki Y, Wakabayashi T, Ohtsuka E, Matsuki S, Ikehara M, Matsubara K, Molecular cloning of the human cholecystokinin gene by use of a synthetic probe containing deoxyinosine, Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(7): 1931-1935

261. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K, Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans, J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85: 4908-4911

262. Tanaka M, Naruo T, Muranaga T, Yasuhara D, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S, Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa, Eur J Endocrinol, 2002, 146: R1-R3

263. Tanaka M, Naruo T, Yasuhara D, Tatebe Y, Nagai N, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S, Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa, Psychoneuroendocrinology, 2003a, 28: 829-835

264. Tanaka M, Naruo T, Nagai N, Kuroki N, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S, Habitual binge/purge behavior influences circulating ghrelin levels in eating disorders, J Psych Res, 2003b, 37(1): 17-22

265. Tanda ML, Lombardi V, Genovesi M, Ultimieri F, Lai A, Gandolfo M, Dalle Mule I, Grasso L, Bogazzi F, Broglio F, Ghigo E, Martino E, Bartalena L, Plasma total and acylated ghrelin concentrations in patients with clinical and subclinical thyroid dysfunction, J Endocrinol Invest, 2009, 32(1): 74-78

266. Taylor AL, Finster JL, Mintz DH, Metabolic clearance and production rates of human growth hormone, J Clin Invest, 1969, 48(12): 2349-2358

267. Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC, Gaytan F, Zhang FP, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E, Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis, Endocrinology, 2002, 143: 717-725

268. Tesauro M, Schinzari F, Iantorno M, Rizza S, Melina D, Lauro D, Cardillo C, Ghrelin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome, Circulation, 2005, 112: 2986-2992

269. Theodoropoulou A, Psyrogiannis A, Metallinos IC, Habeos I, Vgenakis AG, Kyriazopoulou V, Ghrelin response to oral glucose load in hyperthyroidism, before and after treatment with antithyroid drugs, Endocrinol Invest, 2009, 32(2): 94-97

270. Thompson NM, Gill DA, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson IC, Wells T, Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of GHS-R1a, Endocrinology, 2004, 145: 234-242

271. Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M, Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway, Endocrinology, 2003, 144(4): 1506-1512

272. Tremblay F, Perreeault M, Klaman LD, Tobin JF, Smith E, Gimeno RE, Normal food intake and body weight in mice lacking the G protein-coupled receptor GPR39, Endocrinology, 2007, 148: 501-506

273. Troisi A, Di Lorenzo G, Lega I, Tesauro M, Bertoli A, Leo R, Iantorno M, Pecchioli C, Rizza S, Turriziani M, Lauro R, Siracusano A., Plasma ghrelin in anorexia, bulimia, and binge-eating disorder: relations with eating patterns and circulating concentrations of cortisol and thyroid hormones, Neuroendocrinology, 2005, 81(4): 259-266

274. Trudel L, Tomasetto C, Rio MC, Bouin M, Plourde V, Eberling P, Poitras P, Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282(6): G948-952

275. Trudel L, Bouin M, Tomasetto C, Eberling P, St-Pierre S, Bannon P, L'Heureux MC, Poitras P, Two new peptides to improve post-operative gastric ileus in dog, Peptides, 2003, 24(4): 531-534

276. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML, Ghrelin induces adiposity in rodents, Nature, 2000, 407: 908–913

277. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C, Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels, J Endocrinol Invest, 2001a, 24: 19-21

278. Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML, Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity, Diabetes, 2001b, 50: 707-709

279. Tsolakis AV, Portela-Gomes GM, Stridsberg M, Grimelius L, Sundin A, Eriksson BK, Oberg KE, Janson ET, Malignant gastric ghrelinoma with hyperghrelinemia, J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(8): 3739-3744

280. Tsolakis AV, Grimelius L, Stridsberg M, Falkmer SE, Waldum HL, Saras J, Janson ET, Obestatin/ghrelin cells in normal mucosa and endocrine tumours of the stomach, Eur J Endocrinol, 2009, 160(6): 941-949

281. Ueberberg B, Unger N, Saeger W, Mann K, Petersenn S, Expression of ghrelin and its receptor in human tissues, Horm Metab Res, 2009, 41(11): 814-821

282. Unniappan S, Speck M, Kieffer TJ, Metabolic effects of chronic obestatin infusion in rats, Peptides, 2008, 29: 1354-1361

283. Valcavi R, Dieguez C, Preece M, Taylor A, Portiolo I, Scanlon MF, Effect of thyroxine replacement therapy on plasma insulin-like growth factor 1 levels and on growth hormone responces to growth hormone releasing factor factor in hypothyroid patients, Clin Endocrinol (Oxf), 1987, 27: 85-90

284. Valcavi R, Zini M, Portioli I, Thyroid hormones and growth hormone secretion, J Endocrinol Invest, 1992, 15(4): 313-330

285. Vicenatti V, Genghini S, De Iasio R, Pasqui F, Pagotto U, Pasquali R, Circulating obestatin levels and the ghrelin/obestatin ratio in obese women, Eur J Endocrinol, 2007, 157: 295-301

286. Volante M, Allia E, Gugliotta P, Funaro A, Broglio F, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E, Papotti M, Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors, J Clin Endocrinol Metab, 2002a, 87: 1300-1308

287. Volante M, Fulcheri E, Allìa E, Cerrato M, Pucci A, Papotti M, Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung, J Histochem Cytochem, 2002b, 50(8): 1013-21

288. Volante M, Allia E, Fulcheri E, Cassoni P, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M, Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: expression and effects on tumor growth, Am J Pathol, 2003, 162: 645-654

289. Volante M, Rosas R, Ceppi P, Rapa I, Cassoni P, Wiedenmann B, Settanni F, Granata R, Papotti M, Obestatin in human neuroendocrine tissues and tumours: expression and effect on tumour growth, J Pathol, 2009, 218(4): 458-466

290. Wang WG, Chen X, Jiang H, Jiang ZY, Effects of ghrelin on glucose-sensing and gastric distension sensitive neurons in rat dorsal vagal complex, Regul Pept 2008, 146: 169-175

291. Wang Y, Nishi M, Doi A, Shono T, Furukawa Y, Shimada T, Furuta H, Sasaki H, Nanjo K, Ghrelin inhibits insulin secretion through the AMPK-UCP2 pathway in beta cells, FEBS Lett, 2010, 584(8): 1503-1508

292. Waseem T, Javaid-Ur-Rehman, Ahmad F, Azam M, Qureshi MA, Role of ghrelin axis in colorectal cancer: a novel association, Peptides, 2008, 29(8): 1369-1376

293. Wiley KE, Davenport AP, Comparison of vasodilators in human mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1, Br J Pharmacol, 2002, 136: 1146-1152

294. Wierup N., Svensson H., Mulder H., Sundler F, The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas, Regul Pept, 2002, 107: 63-69

295. Williams DL, Cummings DE, Grill HJ, Kaplan JM, Meal-related ghrelin suppression requires postgastric feedback, Endocrinology, 2003a, 144(7): 2765-2767

296. Williams DL, Grill HJ, Cummings DE, Kaplan JM. Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin, Endocrinology, 2003b, 144(12): 5184-5187

297. Williams DL, Cummings DE, Regulation of ghrelin in physiologic and pathophysiologic states, J Nutr, 2005, 135: 1320-1325

298. Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR, The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion, Endocrinology, 2000, 141: 4325-4328

299. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR, Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans, J Clin Endocrinol Metab, 2001a, 86:5992-5995

300. Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR, Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats, Diabetes, 2001b, 50: 2540-2547

301. Yamamoto D, Ikeshita N, Daito R, Herningtyas EH, Toda K, Takahashi K, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K, Okimura Y, Neither intravenous nor intracerebroventricular administration of obestatin affects the secretion of GH, PRL, TSH and ACTH in rats, Regul Pept, 2007, 1:138(2-3): 141-144

302. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL, Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone, Cell, 2008, 132(3): 387-396

303. Yeh AH, Jeffery PL, Duncan RP, Herington AC, Chopin LK, Ghrelin and a novel preproghrelin isoform are highly expressed in prostate cancer and ghrelin activares mitogen-activated protein kinase in prostate cancer, Clin Cancer Res, 2005, 11: 8295-8303

304. Yildiz BO, Suchard MA, Wong ML, McCann SM, Licinio J, Alternations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin and leptin in human obesity, Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 10434-10439

305. Yoshimoto A, Mori K, Sugawara A, Mukoyama M, Yahata K, Suganami T, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K, Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure, J Am Soc Nephrol, 2002, 13(11): 2748-2752

306. Zamrazilová H, Hainer V, Sedlácková D, Papezová H, Kunesová M, Bellisle F, Hill M, Nedvídková J, Plasma obestatin levels in normal weight, obese and anorectic women, Physiol Res, 2008, 57 (Suppl 1): S49-55

307. Zhang JV, Ren P, Avsian-Kretchmer O, Luo C, Rauch R, Klein C, Hsueh AJW, Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake, Science, 2005, 310(5750): 996 – 999

308. Zhang JV, Jahr H, Luo CW, Klein C, Van Kolen K, Ver Donck L, De A, Baart E, Li J, Moechars D, Hsueh AJ, Obestatin induction of early response gene expression in gastrointestinal and adipose tissues and the mediatory role of G-protein-coupled receptor GPR39, Mol Endocrinol, 2008, 22: 1464-1475

309. Zhang YF, Wang HN, Hong TP, Ghrelin expression in the tissues of different thyroid diseases, Beijing Da Xue Xue Bao, 2006, 38: 193-196 (abstrakt)

310. Zhao CM, Furnes MW, Stenström B, Kulseng B, Chen D, Characterization of obestatin- and ghrelin-producing cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rats: an immunohistochemical and electron-microscopic study, Cell Tissue Res, 2008, 331: 575-587

311. Zhou Y, Samson M, Osty J, Francon J, Blondeau JP, Evidence for a close link between the thyroid hormone transport system and the aromatic amino acid transport system T in erythrocytes, J Biol Chem, 1990, 265(28): 17000-17004.

312. Zhu X, Cao Y, Voodg K, Steiner DF, On the Processing of Proghrelin to Ghrelin, J Biol Chem, 2006, 281(50): 38867–38870

313. Zizzari P, Longchamps R, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT, Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents, Endocrinology, 2007, 148: 1648-1653

STRESZCZENIE

Ghrelina i obestatyna są peptydami pochodzącymi ze wspólnego prekursora – prepro-ghreliny. Ghrelina odkryta jako pierwszy naturalny sekretagog (czynnik stymulujący wydzielanie) hormonu wzrostu okazała się także kluczowym regulatorem procesów metabolicznych zwiększającym apetyt, powodującym przyrost masy ciała i nasilającym perystaltykę przewodu pokarmowego. Działanie biologiczne jej siostrzanego peptydu - obestatyny jest przedmiotem dyskusji. Niemniej jednak rozpatrywana jest ona w kategoriach kolejnego czynnika mogącego oddziaływać na stan metaboliczny organizmu.

Tarczyca odgrywa istotną rolę w utrzymaniu równowagi energetycznej. Zaburzenia stanu metabolicznego wpływają na syntezę i wydzielanie hormonów tarczycy, a z drugiej strony hypo- i hypertyreoza prowadzą odpowiednio do spowolnienia i przyspieszenia procesów metabolicznych.

Interesująca zatem wydaje się ewentualna zależność pomiędzy stanem funkcjonalnym tarczycy a produkcją i uwalnianiem ghreliny i obestatyny. Wobec zdolności obu peptydów do modulowania czynności komórek na drodze auto- i parakrynowej, nie można także wykluczyć ich roli jako lokalnych czynników wpływających na funkcje tarczycy.

W niniejszej pracy oceniano stężenia ghreliny i obestatyny w warunkach różnego stopnia wydolności sekrecyjnej tarczycy. Grupę badaną stanowiło 23 chorych z chorych z nadczynnością tarczycy, 15 chorych z nasiloną niedoczynnością tarczycy w przebiegu zapalenia tarczycy typu Hashimoto oraz 19 chorych z niedoczynnością tarczycy po strumektomii całkowitej z powodu raka tarczycy poddawanym badaniom kontrolnym po 4-tygodniowej przerwie w zażywaniu L-tyroksyny. Uzyskane wyniki porównano z grupą 26 zdrowych ochotników. Badanie obejmowało także ocenę stężeń ghreliny i obestatyny przed leczeniem i po uzyskaniu eutyreozy u 10 chorych z niedoczynnością tarczycy w przebiegu przewlekłego zapalenia tarczycy oraz u 15 chorych z nadczynnością tarczycy. Pacjenci z hypertyreozą leczeni radiojodem, u których po podaniu ^{131}I

stwierdzano niedoczynność tarczycy poddawani byli badaniu w momencie rozpoznania choroby, w stadium niedoczynności tarczycy po leczeniu izotopowym oraz po uzyskaniu eutyreozy w wyniku leczenia preparatami L-tyroksyny.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że u chorych z hypotyreozą w przebiegu zapalenia tarczycy typu Hashimoto stężenie ghreliny w osoczu jest znacząco podwyższone i ulega obniżeniu po wyrównaniu czynności tarczycy. Stężenia ghreliny u chorych z niedoczynnością tarczycy po odstawieniu L-tyroksyny przyjmowały wartości pośrednie pomiędzy stężeniami stwierdzanymi u osób zdrowych i u chorych z niedoczynnością tarczycy w zapaleniu typu Hashimoto.

W nadczynności tarczycy obserwowano tendencję do niższych wartości w porównaniu z grupą kontrolną. Po uzyskaniu eutyreozy, pomimo wyraźnego wzrostu BMI badanej grupy, który jest jednym z głównym czynników hamujących wydzielanie ghreliny, nie stwierdzono spadku stężenia ghreliny. U chorych leczonych radiojodem obserwowano niskie stężenie ghreliny w stadium nadczynności tarczycy, wzrost stężenia ghreliny w hypotyreozie oraz wartość pośrednią stężenia ghreliny w stadium eutyreozy.

Analiza regresji wykazała, że istotny wpływ na zmienność ghreliny w grupie kontrolnej i grupie badanej wykazywały TSH oraz BMI osób badanych.

Stężenie drugiego z peptydów – obestatyny u chorych z niedoczynnością tarczycy po strumektomii całkowitej było wyższe niż u osób zdrowych. W niedoczynności tarczycy w zapaleniu typu Hashimoto pomimo wyjściowych stężeń obestatyny nie różniących się istotnie od grupy osób zdrowych, po wyrównaniu czynności tarczycy L-tyroksyną odnotowano znaczący spadek stężenia obestatyny. Nie stwierdzono różnic w stężeniu obestatyny pomiędzy nadczynnością tarczycy a grupą kontrolną.

Wykazano pozytywną korelację pomiędzy stężeniem obestatyny i ghreliny.

Drugą część badania stanowiła analiza ekspresji ghreliny i obestatyny w tkance tarczycy metodą immunohistochemiczną. Ocenie poddano materiał wola guzowatego obojętnego, raka brodawkowatego tarczycy, raka rdzeniastego

tarczycy, przypadek mieszanego raka pęcherzykowo-rdzeniastego oraz zdrową tkankę tarczycy.

Ekspresję ghreliny obserwowano w komórkach pęcherzykowych i okołopęcherzykowych zdrowej tarczycy, wola guzowatego obojętnego oraz w komórkach nowotworowych raków tarczycy. W porównaniu ze zdrową tkanką tarczycy i wolem guzowatym obojętnym, ekspresja ghreliny w komórkach raka brodawkowatego i mieszanego raka pęcherzykowo-rdzeniastego była wyraźnie silniejsza. W raku rdzeniastym tarczycy obecność ghreliny wykazywano w pojedynczych komórkach nowotworowych.

Występowanie obestatyny stwierdzano najczęściej w tej samej lokalizacji, w której odnotowywano odczyn dla ghreliny - najczęściej w komórkach okołopęcherzykowych, rzadziej w komórkach pęcherzykowych zdrowej tarczycy, wola guzowatego obojętnego i nowotworów złośliwych tarczycy. Immunoreaktywność obestatyny była jednak nierównomiernie nasilona i słabsza od ekspresji ghreliny.

Zmiany w stężeniu ghreliny w przebiegu nadczynności i niedoczynności tarczycy skłaniają do rozważenia jej roli jako czynnika kompensującego zaburzenia stanu metabolicznego u tych chorych. W warunkach niedoboru hormonów tarczycy wzrost stężenia ghreliny powoduje bowiem nasilenie procesów metabolicznych i odpowiednie wykorzystanie zasobów energetycznych organizmu. Z kolei w nadczynności tarczycy niskie stężenie ghreliny prowadzi do zmniejszenia tempa metabolizmu i redukcji patologicznie zwiększonego wydatku energetycznego. Pozytywna korelacja pomiędzy stężeniem ghreliny i obestatyny nie wyklucza modulującej roli obestatyny w zakresie tych mechanizmów.

Zróżnicowanie ekspresji ghreliny i obestatyny w tarczycy w zakresie komórek pęcherzykowych i komórek C, a także zakresie nasilenia odczynu pomiędzy komórkami zdrowymi i nowotworowymi może odzwierciedlać znaczenie funkcjonalne obu peptydów w tkance tarczycy.

SUMMARY

Ghrelin and obestatin are two peptides deriving from the same precursor – prepro-ghrelin. Ghrelin was discovered as the first natural growth hormone secretagogue – a factor stimulating growth hormone release. However, it also proved to be an essential regulator of metabolism, which increases appetite, body weight and stimulates stomach and bowel peristalsis. The biological activity of obestatin is still discussed. However, this peptide is also considered as another possible modulator of metabolic processes.

Thyroid gland plays an important role in the maintenance of energy balance. Metabolic disturbances influence thyroid hormones release and, on the other hand, hyper- and hypothyroidism increases and decreases the rate of metabolism respectively.

Therefore, relationship between thyroid function and ghrelin and obestatin production is worth considering. In addition, since both peptides are able to influence cell function in auto- and paracrine way, it is possible, that they may act as local modulators of thyroid cells.

In his study plasma ghrelin and obestatin levels were evaluated in different states of thyroid function. The study group consisted of 23 patients with hyperthyroidism, 15 patients with severe hypothyroidism due to Hashimoto thyroiditis and 19 patients with hypothyroidism, who had undergone total thyroidectomy and were examined after 4-week discontinuation of L-thyroxine replacement. The control group consisted of 26 healthy volunteers. The evaluation of ghrelin and obestatin concentrations was repeated in 15 patients with hyperthyroidism and 10 patients with hypothyroidism, who became euthyroid after treatment. Patients with hyperthyroidism treated with radioactive iodine, who developed hypothyroidism were examined three times – in hyper-, hypo- and euthyroid state.

The study revealed, that in hypothyroidism due to Hashimoto thyroiditis ghrelin level is significantly higher and decreases after treatment. Ghrelin

concentrations in patients after thyroidectomy were intermediate between levels noted patients with Hashimoto thyroiditis and healthy subjects.

In hyperthyroidism a tendency to low ghrelin levels was observed. In addition, although patients' BMI increased after treatment, what is known to inhibit ghrelin production, the reduction of ghrelin concentration was not observed. Patients treated with radioactive iodine presented low ghrelin levels in hyperthyroidism, high ghrelin concentrations in hypothyroidism and intermediate in euthyroid state.

The analysis of regression revealed, that TSH and BMI significantly influenced ghrelin level.

Plasma concentration of obestatin was higher in patients after thyroidectomy in comparison to healthy subjects. In hypothyroidism due to Hashimoto thyroiditis obestatin level was similar to control group. However, it significantly decreased after treatment. No changes of obestatin level were observed in hyperthyroidism.

There was a positive correlation between ghrelin and obestatin concentrations.

The study included also the immunohistochemical evaluation of ghrelin and obestatin expression in thyroid tissue. The analyzed material consisted of 7 cases of nodular goiter, 4 cases of papillary thyroid cancer, 10 cases of medullary thyroid cancer and one case of mixed medullary and follicular thyroid cancer. They were compared to 4 cases of normal thyroid tissue operated due to suspected malignancy in collateral lobe.

Ghrelin expression was observed in follicular and parafollicular cells of normal thyroid tissue and nodular goiter, as well as in neoplastic cells of thyroid cancers. In comparison to normal tissue and nodular goiter, ghrelin immunoreactivity in papillary cancer and mixed medullary and follicular thyroid cancer was stronger. In medullary cancer ghrelin expression was noted in single neoplastic cells.

In immunohistochemical evaluation obestatin was mainly observed to be co-expressed with ghrelin – in parafollicular, follicular and cancer cells. However,

the immunohistochemical reaction for obestatin was heterogeneous and not that strong as for ghrelin.

Plasma ghrelin changes in thyroid dysfunction may indicate a compensatory role of this peptide in metabolic disturbances. In state of thyroid hormone deficiency high ghrelin concentration increases metabolism rate and leads to appropriate use of energy resources. In hyperthyroidism low ghrelin level decreases metabolism rate and reduces energy expenditure, that is considerably increased in these patients. The positive correlation between ghrelin and obestatin concentrations does not exclude a modulatory role of obestatin in these processes.

The differences in immunohistochemical expression of ghrelin and obestatin between thyreocytes and parafollicular cells, as well as between normal and pathological thyroid tissue may reflect the functional activity of both peptides in thyroid gland.

SPIS TABEL

Tab. 1 Stężenie ghreliny w osoczu krwi na czczo w różnych stanach czynnościowych tarczycy (pg/ml) (NS – nieistotne statystycznie). 30
Tab. 2 Charakterystyka kliniczna i biochemiczna grupy badanej oraz grupy kontrolnej (średnia ± SD) (nb – nie badano). 53
Tab. 3 Charakterystyka biochemiczna grupy 10 chorych z niedoczynnością tarczycy przed i po leczeniu 58
Tab. 4 Charakterystyka biochemiczna 15 chorych z nadczynnością tarczycy przed i po leczeniu 60
Tab. 5 Charakterystyka biochemiczna 7 pacjentów z nadczynnością tarczycy leczonych radiojodem badanych w trzech stanach czynnościowych tarczycy: w nadczynności tarczycy przed leczeniem, w niedoczynności tarczycy po podaniu jodu promieniotwórczego i po wyrównaniu czynności tarczycy (x – błąd zestawu RIA) 62

SPIS RYCIN

Ryc. 1 Struktura genu prepro-ghreliny (*GHRL*) wg Seim i wsp. (2007) 11
Ryc. 2 Produkty genu ghreliny wg Soares i Leite-Moreira (2008) 12
Ryc. 3 Struktura cząsteczki ghreliny acylowanej kwasem kaprylowym wg Méndez-Sánchez i wsp. (2006). 13
Ryc. 4 Helikalna struktura fragmentu obestatyny {1–23} (A) i obestatyny {11-23}(B) wg Subasinghage i wsp. (2010) 15
Ryc. 5 Dobowy profil stężeń ghreliny u chorych z otyłością przed i po redukcji masy ciała wg Williams i Cummings (2005). 24
Ryc. 6 Pęcherzyki tarczycy wypełnione koloidem. Barwienie hematoksylina i eozyną. Powiększenie obiektywu: 40x. 38
Ryc. 7 Przemiany jodotyronin (T_4 - 3,5,3',5'-tetrajodotyronina, tyroksyna, T_3 - 3,5,3 – trójjodotyronina, rT_3- 3,3',5'-rewers-trójjodotyronina, T_2 – dijodotyronina, D1 – dejodynaza 1, D2 – dejodynaza 2, D3 – dejodynaza 3) wg Nauman i wsp. (2008) 39
Ryc. 8 Stężenie ghreliny w osoczu w poszczególnych stanach czynnościowych tarczycy: w eutyreozie (kontrola), w niedoczynności tarczycy w przebiegu zapalenia tarczycy typu Hashimoto (HT Hashimoto), w niedoczynność tarczycy po strumektomii całkowitej (HT po strumektomii) oraz w nadczynności tarczycy (NT). 55
Ryc. 9 Stężenie obestatyny w osoczu w poszczególnych stanach czynnościowych tarczycy: w eutyreozie (kontrola), w niedoczynności tarczycy w przebiegu zapalenia tarczycy typu Hashimoto (HT Hashimoto), w niedoczynności tarczycy po strumektomii całkowitej (HT po strumektomii) oraz w nadczynności tarczycy (NT). 56
Ryc. 10 Wskaźnik masy ciała (BMI) w grupie kontrolnej, w grupie chorych z niedoczynnością tarczycy w przebiegu zapalenia tarczycy typu Hashimoto (HT Hashimoto), z niedoczynnością tarczycy po strumektomii całkowitej (HT po strumektomii) oraz u chorych z nadczynnością tarczycy (NT). 57
Ryc. 11 Stężenie ghreliny w osoczu chorych z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto w stadium niedoczynności tarczycy (ghrelina 1) oraz w stadium eutyreozy po leczeniu L-tyroksyną (ghrelina 2). 58
Ryc. 12 Stężenie obestatyny w osoczu chorych z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto w stadium niedoczynności tarczycy (obestatyna 1) oraz w stadium eutyreozy po leczeniu L-tyroksyną (obestatyna 2). 59

Ryc. 13 BMI chorych z zapaleniem tarczycy typu Hashimoto w stadium niedoczynności tarczycy (BMI 1) oraz w stadium eutyreozy po leczeniu L-tyroksyną (BMI 2). 59
Ryc. 14 Stężenie ghreliny w osoczu chorych z nadczynnością tarczycy przed leczeniem (ghrelina 1) i po leczeniu (ghrelina 2). 60
Ryc. 15 Stężenie obestatyny w osoczu chorych z nadczynnością tarczycy przed leczeniem (obestatyna 1) i po leczeniu (obestatyna 2). 61
Ryc. 16 BMI chorych z nadczynnością tarczycy przed leczeniem (BMI 1) oraz po leczeniu (BMI 2). 61
Ryc. 17 Immunohistochemiczna ekspresja ghreliny w zdrowej tarczycy (17a), wolu guzowatym obojętnym (17b), raku brodawkowatym tarczycy (17c) i raku rdzeniastym (17d). Technika ABC. Powiększenie obiektywu 40x (a,b,c) i 100x (d). 63
Ryc. 18 Immunohistochemiczna ekspresja obestatyny w zdrowej tarczycy (18a), wolu guzowatym obojętnym (18b), raku brodawkowatym tarczycy (18c) i raku rdzeniastym tarczycy (18d). Technika ABC. Powiększenie obiektywu 40x. 64
Ryc. 19 Koekspresja ghreliny (a, c) i obestatyny (b, d) w mieszanym raku pęcherzykowo-rdzeniastym tarczycy. Technika ABC. Powiększenie obiektywu 40x... 64

ZAŁĄCZNIKI

załącznik 1

Informacja dla osób uczestniczących w badaniu „Ekspresja ghreliny i obestatyny w różnych stanach funkcjonalnych tarczycy”

Ghrelina i obestatyna są niedawno odkrytymi peptydami o potencjalnym wpływie na czynność tarczycy. W powyższym badaniu planowana jest analiza stężenia obu peptydów w osoczu krwi pacjentów z nadczynnością i niedoczynnością tarczycy oraz porównanie ich z wartościami stwierdzanymi u osób zdrowych. Pozwoli to na określenie ewentualnych zależności pomiędzy ghreliną i obestatyną a stanem czynnościowym tarczycy, co w przyszłości może przyczynić się do powstania nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych w zakresie chorób tarczycy.

1) Badanie podmiotowe (wywiad lekarski) i przedmiotowe przeprowadzone przez lekarza pozwolą na podstawową ocenę stanu zdrowia pacjenta.
2) Badania dodatkowe obejmują oznaczenie poziomu hormonów (TSH, fT_3, fT_4) oraz przeciwciał przeciwtarczycowych (TRAb, aTPO, aTg) w osoczu i wymagają oddania ok. 20 ml krwi. Celem oznaczenia poziomu ghreliny i obestatyny dodatkowe 7 ml krwi zostanie pobrane do kolejnej probówki.
3) Badanie ultrasonograficzne (USG) umożliwi ocenę obrazową gruczołu tarczowego. Jeśli w badaniu uwidocznione zostaną guzki wymagające biopsji, będzie ona wykonana za zgodą pacjenta.
4) Po zastosowaniu leczenia podczas planowych badań kontrolnych (TSH, fT_3, fT_4) stężenie ghreliny i obestatyny zostanie oznaczone ponownie (7 ml krwi do kolejnej probówki przy tym samym pobraniu).
5) U pacjentów po strumektomii totalnej z powody raka tarczycy wykonany zostanie pomiar stężenia tyreoglobuliny w osoczu krwi i scyntygrafia całego ciała (w ramach badań zaplanowanych podczas hospitalizacji).

załącznik 2

OŚWIADCZENIE

Ja, (imię i nazwisko) …...…….. zamieszkała(y)…….……
……..…….……...……...
oświadczam, że otrzymałam (em) pisemną informację dotyczącą badań w ramach projektu pt. „Ekspresja ghreliny i obestatyny w różnych stanach funkcjonalnych tarczycy” i wyrażam zgodę na udział w tych badaniach.

…….

/data i podpis/