

UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU
KATEDRA I ZAKŁAD FARMAKOLOGII

Michał Szulc

**ROLA GRELINY W OCENIE SKUTECZNOŚCI
ŚRODKÓW PRZECIWALKOHOLOWYCH**

ROZPRAWA DOKTORSKA

PROMOTOR: doc. dr hab. n. farm. Przemysław Mikołajczak

Poznań, 2011

Praca doktorska została zrealizowana
w ramach projektu badawczego
nr. NN 405 358737
finansowanego przez
Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

*Składam serdeczne podziękowania
mojemu Promotorowi,
Panu doc. dr hab. n. farm. Przemysławowi Mikołajczakowi
za inspirację, opiekę merytoryczną, zaangażowanie,
cenne wskazówki i poświęcony czas.*

Pani Profesor dr hab. n. farm.

Teresie Bobkiewicz-Kozłowskiej

*za życzliwość i stworzenie doskonałych warunków pracy,
serdecznie dziękuję.*

dziękuję bardzo

Pani dr n. farm. Irenie Okulicz-Kozaryn i

Pani dr n. biol. Ewie Kamińskiej

za serdeczność, życzliwość, wsparcie

i gotowość do pomocy na każdym etapie mojej pracy.

*Panu Profesorowi dr hab. farm. Romanowi Wachowiakowi
mgr Bognie Geppert i mgr Arturowi Teżykowi
za życzliwą pomoc i analizę ilościową alkoholu we krwi
serdecznie dziękuję.*

*Pracę tę dedykuję mojej żonie Annie,
bez której wsparcia, cierpliwości i zrozumienia
nie mógłbym doprowadzić tej pracy do końca.*

Spis treści

1. WYKAZ SKRÓTÓW	3
2. WSTĘP	4
2.1. Alkoholizm	5
2.1.1. Typologia alkoholizmu	6
2.1.2. Tolerancja alkoholowa	7
2.1.3. Zespół abstynencyjny	8
2.1.4. Biologiczne podstawy choroby alkoholowej - rola wybranych peptydów	9
2.2. Farmakoterapia alkoholizmu.....	13
2.2.1. Naltrekson (NAL).....	13
2.2.2. Akamprozat (AC)	14
2.3. Środki pochodzenia roślinnego	15
2.3.1. Kudzu (KU).....	15
2.3.2. Daidzyna (DAI)	16
2.3.3. Pueraryna (PUE).....	17
2.4. Grelina.....	18
2.4.1. Stuktura, receptor i geny.....	18
2.4.2. Podstawowe formy greliny	21
2.4.3. Komórkowy mechanizm działania greliny	24
2.4.4. Rola greliny w organizmie.....	24
2.4.5. Działanie ośrodkowe greliny	29
2.4.6. Grelina w badaniach klinicznych.....	33
2.4.7. Grelina a alkohol	34
2.4.7.1.Grelina a alkohol u zwierząt doświadczalnych.....	34
2.4.7.2.Grelina a alkohol w badaniach klinicznych	35
3. CEL BADAŃ.....	38
4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	39
4.1. Materiały i metody	39
4.1.1. Odczynniki i leki	39
4.1.2. Zwierzęta	39
4.1.2.1.Szczury Wistar.....	40
4.1.2.2.Szczury WHP i WLP.....	40

4.1.3. Pomiar masy ciała zwierząt	40
4.1.4. Proces wyodrębniania zwierząt PR i NP	41
4.1.5. Jednorazowe dootrzewnowe podanie etanolu.....	42
4.1.6. Badanie rozwoju tolerancji	43
4.1.7. Pobieranie i zabezpieczanie surowicy do oznaczeń poziomów greliny.....	43
4.1.8. Oznaczanie poziomu etanolu we krwi obwodowej.....	44
4.1.9. Oznaczanie poziomu greliny aktywnej i całkowitej	44
4.2. Analiza statystyczna.....	45
5. WYNIKI	46
5.1. Fizjologiczne poziomy greliny u szczurów Wistar, WLP i WHP.....	46
5.2. Wpływ jednorazowego podania etanolu na poziomy greliny w surowicy szczurów Wistar	47
5.3. Wpływ jednorazowego podania etanolu na poziomy greliny w surowicy szczurów WLP i WHP	49
5.4. Wpływ etanolu na rozwój tolerancji u szczurów WHP	52
5.5. Wpływ preferencji na poziomy greliny	55
5.5.1. Poziomy greliny u szczurów Wistar, NP i PR.....	55
5.5.2. Poziomy greliny u szczurów Wistar, WLP i WHP	56
5.5.3. Wpływ picia alkoholu na poziomy greliny u szczurów WLP i WHP.....	57
5.5.4. Porównanie poziomów greliny u szczurów NP, PR, WLP i WHP	58
5.6. Wpływ wielokrotnego podania akamprozatu na poziomy greliny	61
5.7. Wpływ wielokrotnego podania naltreksonu na poziomy greliny.....	65
5.8. Wpływ wielokrotnego podania kudzu na rozwój tolerancji i poziomy greliny	68
5.9. Wpływ wielokrotnego podania kudzu na poziomy greliny	72
5.10. Wpływ wielokrotnego podania daidzyny na poziomy greliny.....	74
5.11. Wpływ wielokrotnego podania pueraryny na poziomy greliny	77
6. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA.....	80
7. WNIOSKI.....	91
8. STRESZCZENIE	92
9. SUMMARY	94
10. SPIS RYCIN I TABEL	96
11. PIŚMIENNICTWO.....	100

WYKAZ SKRÓTÓW

5-HT	serotonina (5-hydroksytryptamina)
AC	akamprozat
ACTH	hormon adrenokortykotropowy (<i>Adrenocorticotropic Hormone</i>)
AgRP	peptyd Agouti (<i>Agouti-Related Peptide</i>)
AN	jądro migdałowe (<i>amygdaloid nucleus</i>)
CART	transkrypty dla CART (<i>Cocaine and Amphetamine Regulated Transcripts</i>)
CRH	kortykoliberyna (<i>corticotropin-releasing hormone</i>)
DA	dopamina
DAI	daidzyna
GABA	kwasy γ -aminomasłowe
GABA-A	receptor jonotropowy dla kwasu γ -aminomasłowego
GH	hormon wzrostu (<i>growth hormone</i>)
GHRH	somatoliberyna (<i>growth-hormone-releasing hormone</i>)
GHRP	peptyd uwalniający GH (<i>growth hormone releasing peptide</i>)
GHS	związki uwalniające GH (<i>growth hormone secretagogues</i>)
GHS-R	receptor sierocy dla GH (<i>orphan growth hormone secretagogue receptor</i>)
GHS-R1a	receptor gelinowy dla GH (<i>ghrelin growth hormone secretagogue receptor 1a</i>)
GOAT	ghrelinowa O-acetylotransferaza (<i>ghrelin O-acyltransferase</i>)
KU	ekstrakt z korzenia ołownika łatkowatego (<i>Pueraria lobata</i>) - kudzu
MC	metyloceluloza
NA	noradrenalina
NAc	jądro półleżące (<i>nucleus accumbens</i>)
NAL	naltrekson
NARC	jądro łukowate hipokampu (<i>nucleus arcuatus</i>)
NMDA	N-metylo-D-asparaginian i receptor dla tego związku
NO	tlenek azotu (<i>nitric oxide</i>)
NP	szczury niepreferujące picia alkoholu z wolnego wyboru
NPY	neuropeptyd Y
POMC	proopiomelanokortyna
PR	szczury preferujące picie alkoholu z wolnego wyboru
PUE	pueraryna
PVN	jądro przykomorowe hipokampu (<i>paraventricular nucleus</i>)
SSRI	selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny
VTA	brzusze pole nakrywki śródmózgowia (<i>ventral tegmental area</i>)
WHP	szczury preferujące pochodzące z linii (Warsaw High Preferring)
WLP	szczury niepreferujące pochodzące z linii (Warsaw Low Preferring)

1. Wstęp

Coraz częściej podkreśla się udział peptydów w rozwoju alkoholizmu oraz ich możliwą rolę jako ewentualnych wskaźników obwodowych związanych z tym uzależnieniem [Schneider i wsp. 2007]. Wydaje się, że do najlepiej rozpoznanych związków możemy zaliczyć układ alkohol – neuropeptyd Y (NPY) oraz alkohol – leptyna. Ta ostatnia zależność wydaje się szczególnie interesująca, bowiem jak wiadomo peptyd ten, jako sygnał sytości, powstaje na obwodzie i stąd mógłby służyć jako ewentualny wskaźnik związany z alkoholizmem [Mikołajczak i wsp. 2002, Wurst i wsp. 2007]. Wiadomo też, że leptyna wydaje się pozostawać w pewnej funkcjonalnej równowadze z innym obwodowym peptydem zaangażowanym w sygnał związany z odczuwaniem głodu i sytości, a mianowicie z greliną [Gao i Horvath 2007].

Stosunkowo niedawno pojawiły się prace [Wurst i wsp. 2007, Zimmermann i wsp. 2007], w których sugerowano, iż grelina być może bierze udział w patogenezie choroby alkoholowej, a jej poziom jest dodatnio skorelowany z okresem abstynencji u alkoholików, choć wiele kwestii związanych z działaniem greliny jest nierozwiązanych, jak choćby wzrost czy spadek stężenia tego peptydu u alkoholików podczas okresu aktywnego picia [Badaoui i wsp. 2008].

Z szerokiej gamy przebadanych potencjalnych leków o właściwościach zmniejszających picie alkoholu i wydłużających okres abstynencji poprzez nieawersyjne oddziaływanie, obecnie tylko akamprozat (AC) i naltrekson (NAL) są uważane za leki o udowodnionej skuteczności [Lesch i wsp. 2001]. Należy jednak podkreślić, iż oba te środki nie mogą być stosowane we wszystkich przypadkach. Jest to związane z niejednorodnością (heterogennością) etiopatogenezy uzależnienia alkoholowego [Lesch i wsp. 2001], w której tak składowe środowiskowe jak i predyspozycje genetyczne mogą grać istotną rolę. Stąd, być może, heterogenność alkoholizmu związana z udziałem różnych mechanizmów neuroprzekąźnikowych w danym momencie choroby jest przyczyną ograniczonej skuteczności stosowanej farmakoterapii tego uzależnienia.

Badania mające na celu znalezienie wskaźnika uzależnienia alkoholowego mogą więc być pomocne zarówno do lepszego zdiagnozowania alkoholizmu jak i oceny skuteczności leczenia farmakologicznego. Jak dotychczas, nie znaleziono takiego wskaźnika, który charakteryzowałby się odpowiednią czułością i specyficznością związaną z tym uzależnieniem. Obecnie najczęściej stosowanymi wskaźnikami o udowodnionej wartości diagnostycznej są gammaglutamylotransferaza (transpeptydaza GGT), całkowita

transaminaza asparaginianowa (AST) i średnia objętość erytrocytu (MCV) [Niemelä i Alatalo 2007].

Niemniej żaden z tych markerów nie jest swoisty, tj. zarówno ich czułość jak i specyficzność nie są wystarczające, aby wykluczyć wpływ innych patologicznych czynników na otrzymywane wyniki. Również stosowane coraz częściej zdesjalowana transferyna czy kwas sjałowy jako biologicznych markerów nie spełnia wszystkich kryteriów idealnego wskaźnika choroby alkoholowej [Chrostek i wsp. 2007]. Stąd poszukiwanie markerów, które lepiej pozwoliłyby ocenić genetyczne predyspozycje, lub stan pacjenta w czasie nadużywania alkoholu stanowi ciągle przedmiot zainteresowań wielu badaczy [Niemelä i Alatalo 2007, Bianchi 2010].

Badania zaprezentowane w niniejszej pracy pozwolą być może odpowiedzią na pytania czy grelina uczestniczy w ośrodkowym działaniu alkoholu i czy ewentualnie może stanowić wskaźnik zmian towarzyszących picciu alkoholu. Pozwolą one także ocenić wpływ uznanych leków przeciwalkoholowych działających poprzez układ pobudzających aminokwasów (AC), układ opioidowy (NAL) czy środka o spodziewanym działaniu przeciwalkoholowym pochodzenia roślinnego - wyciągu z korzenia ołownika łatkowatego (*Pueraria lobata*) (KU) oraz jego izoflawonoidów – pueraryny (PUE) i daidzyny (DAI) na efekty picia alkoholu oraz określenia na ile te efekty korespondują z poziomami greliny we krwi obwodowej zwierząt.

1.1. Alkoholizm

Termin alkoholizmu obejmuje szereg zmian, zarówno fizycznych, jak i psychicznych, związanych z długotrwałym picciem alkoholu, których skutkiem jest nieodparta chęć picia alkoholu w celu osiągnięcia euforii i zniesienia nieprzyjemnych objawów abstynencji. Prowadzi to do wielu niekorzystnych zmian w funkcjonowaniu organizmu łącznie z marskością wątroby, zmianami miażdżycowymi, zmianami w przewodzie pokarmowym, zaburzeniami neurologicznymi i psychicznymi, działaniem anorektycznym oraz ogólnym wyniszczeniem organizmu. Toksyczne działanie etanolu wynika z działania samego etanolu na tkanki organizmu jak i z oddziaływania jego metabolitów: aldehydu octowego i kwasu octowego [Seńczuk 2002].

Nadmierne spożywanie alkoholu i uzależnienie od alkoholu jest poważnym problemem medycznym, społecznym, i ekonomicznym [Global status report on alcohol and health, WHO 2011].

Pomimo rozpowszechnienia tego zjawiska oraz jego poważnych konsekwencji, nadal brak dobrych metod diagnostycznych oraz efektywnych i bezpiecznych metod leczenia. Dlatego głównym celem badań i poszukiwań nowych związków o działaniu leczniczym jest znalezienie związków selektywnie redukujących symptomy odstawienia, ułatwiających osiągnięcie stanu abstynencji, znoszących lub zmniejszających poalkoholową toksycność oraz zapobiegających powrotowi do nałogu [Schuckit 2009].

Zaobserwowano, że istnieją różnice między uzależnieniem od alkoholu u kobiet i u mężczyzn [Dawson i Archer 1992, Diehl i wsp. 2007]. U mężczyzn obserwuje się częściej dziedziczenie alkoholizmu, natomiast u kobiet jest to z reguły wpływ środowiskowy [Jang i wsp. 1997, Moscato i wsp. 1997, van den Bree i wsp. 1998]. Rozwój uzależnienia od alkoholu w dużej mierze zależy od jego wpływu na układ nagrody w mózgu, omówionego szerzej w rozdziale 1.1.4 [Tupala i Tiihonen 2004]. Układ ten decyduje o osobniczym wpływie takich czynników jak jedzenie czy substancje uzależniające (alkohol, nikotyna, kokaina) [Engel i wsp. 1988, Volkow i wsp. 2002, Di Chiara 2005]. Obserwuje się dużą współzależność uzależnienia od nikotyny i alkoholu - ponad 90% uzależnionych od alkoholu pali papierosy [Bin i Burge 1990] jak i między zaburzeniami jedzenia a uzależnieniem od tych substancji [Falk i wsp. 2006, Volkow i wsp. 2003].

Złożoność problemu, jakim jest uzależnienie od alkoholu stwarza poważne wyzwanie dla poszukiwań wiarygodnych i precyzyjnych markerów dla diagnostyki tego uzależnienia, a badania nad związkami skutecznymi w jego leczeniu wymagają poszukiwania innych, być może nowych punktów uchwytu dla nowych leków syntetycznych i pochodzenia roślinnego [Heilig i Egli 2006, Mikołajczak 2006, Johnson 2008, Soyka i wsp. 2008].

1.1.1. Typologia alkoholizmu

Alkoholicy jako pacjenci stanowią grupę bardzo niejednorodną. Na możliwość wystąpienia alkoholizmu wpływ ma wiele czynników, takich jak: cechy osobowości z okresu przed uzależnieniem, występowanie alkoholizmu i chorób afektywnych w rodzinie, współwystępowanie zaburzeń psychicznych, początek uzależnienia (wiek chorego), stopień uzależnienia, czynniki genetyczne, płeć i inne. Ze względu na te i inne cechy, alkoholizm był dzielony początkowo na dwa typy opracowane przez Cloningera - tzw. typ 1 (żeński) i typ 2 (męski) [Cloninger 1987, Cloninger i wsp. 1988], a Lesch i wsp. udowodnili istnienie 4 typów alkoholizmu [Lesch i wsp. 1990, 1996, 2001]. Według Cloningera typ 1 ma być silniej związany ze środowiskiem, występuje zwykle po 25 roku życia i jest bardziej typowy dla

kobiet oraz osób neurotycznych ze skłonnościami do depresji. Natomiast typ 2 według tej typologii związany jest raczej z płcią męską, charakteryzuje się wcześniejszym występowaniem (przed 25 rokiem życia), ma wysoki stopień przenoszenia genetycznego z ojca na syna oraz niewielki udział wpływu środowiska. Z kolei Lesch i wsp. uważają, że pierwszy typ („alergiczny”) jest związany przede wszystkim z występowaniem silnych, fizycznych objawów odstawienia, wraz z pojawieniem się psychoz alkoholowych i drgawek, w drugim typie często pojawiają się lęk, trauma, agresywność (objawy tzw. dyzinhibicji). Z kolei w trzecim typie wg Lescha występują silne zmiany afektu o charakterze depresyjnym, a picie alkoholu ma być środkiem przeciwdziałającym tym zmianom. Występowanie czwartego typu ma być najbardziej skorelowane z udziałem zmian organicznych w mózgu (zwłaszcza <14 roku życia), silną składową genetyczną (występowanie rodzinnego alkoholizmu) oraz udziałem innych zaburzeń psychicznych. Niektórzy polscy naukowcy zaproponowali istnienie trzech podtypów w ramach tzw. typu 2 (męskiego) [Hauser i Rybakowski 1997]. Stosunkowo niedawno na podstawie badań przeprowadzonych przez Cardoso i wsp. pojawiła się jeszcze bardziej złożona typologia (tzw. NET) zakładająca istnienie 5 głównych grup [Cardoso i wsp. 2006]. Należy podkreślić, że w dalszym ciągu sprawa typologii jest przedmiotem ciągłych analiz w ramach ww. jak i innych klasyfikacji włączając w to znaczenie tzw. biomarkerów [Li i wsp. 2007, Pombo i Lesch 2009].

1.1.2. Tolerancja alkoholowa

Mechanizmy rozwoju tolerancji na alkohol nie są w pełni poznane [Lieber 2005]. Generalnie, po mniej lub bardziej długotrwałym zażywaniu alkoholu organizm kompensuje jego nadmierne ilości na trzy sposoby [Lieber 2005], poprzez:

1. tolerancję metaboliczną (farmakokinetyczną) pojawiającą się po piciu przez 1-2 tygodni - szybkość metabolizmu etanolu wzrasta o około 30%,
2. tolerancję komórkową (farmakodynamiczną) - jako złożony proces adaptacyjny wpływający na funkcjonowanie błony komórkowej neuronu (przepływ jonów, transdukcja sygnału, różne zmiany biochemiczne komórki), które po odstawieniu etanolu nie wracają do stanu normalnego przez wiele tygodni i są prawdopodobnie odpowiedzialne za powstawania zależności fizycznej,

3. tolerancję behawioralną - nawet przy dużym stężeniu etanolu oraz długotrwałych zmianach adaptacyjnych organizm funkcjonuje lepiej niż można się tego spodziewać.

Przyjmuje się jednak, że nadmierne spożywanie alkoholu przez dłuższy czas jak i genetyczne predyspozycje powodują w konsekwencji zmiany w neurochemii mózgu u alkoholików [Tambour i Quertemont 2007].

Uważa się, że zmiany te powodują rozwój tolerancji oraz niepożądaną chęć picia. Tolerancja powoduje zmniejszenie przyjemnościowych skutków działania i prowadzi do ciągłego zwiększania dawki alkoholu w celu uniknięcia zespołu odstawienia [Koob 2003]. Dla tolerancji alkoholowej charakterystyczny jest wzrost aktywności receptorów opioidowych, aktywności kortykoliberyny (CRH), wysokie powinowactwo alkoholu do receptorów GABA-A oraz niskie powinowactwo do receptorów NMDA. Natomiast zespół odstawienia charakteryzuje się wysoką aktywnością receptorów NMDA i niską receptorów GABA-A, co jest zauważalne w symptomach zespołu odstawienia takich jak nadciśnienie, czy występowanie drgawek [Kostowski i Herman 2003].

1.1.3. Zespół abstynencyjny

Zespół abstynencyjny (zespół odstawienia) – jest to zespół objawów charakterystycznych dla uzależnienia fizycznego, takich jak: drżenie mięśni, tiki nerwowe, mdłości, bóle głowy, przyspieszona akcja serca. W sferze psychicznej pojawiają się stany lękowe, pobudzenie ruchowe, niepokój, depresja, zaburzenia snu, poczucie ogólnego rozbicia. [Wasilewski i wsp. 2000, Kostowski i Herman 2003].

U osoby uzależnionej dalsze spożywanie alkoholu służy przede wszystkim uniknięciu tych negatywnych objawów. Mechanizm ten można wiązać z oddziaływaniem etanolu na układ GABA-ergiczny i glutaminianergiczny, chociaż rola wielu innych neurotransmiterów, np. noradrenaliny (NA), serotoniny (5-HT) czy dopaminy (DA) jest także postulowana w wielu pracach [Johnson 2008].

1.1.4. Biologiczne podstawy choroby alkoholowej - rola wybranych peptydów

Klinicznym objawem uzależnienia jest zespół objawów somatycznych i psychicznych związanych z brakiem kontroli nad stosowaniem danej substancji i używaniem jej mimo niekorzystnych następstw. Struktury mózgowie odpowiedzialne za powstawanie uzależnienia, związane są z tzw. układem nagrody. Podstawę tego układu stanowi głównie szlak dopaminergiczny, który biegnie od brzuszno-polejowego jądra śródmózgowia (VTA, *ventral tegmental area*) do kory przedczołowej i jądra półleżącego (NAc, *nucleus accumbens* - struktury układu limbicznego), co stanowi wspólną drogę końcową działania nagradzającego większości substancji uzależniających [Bilikiewicz 2002]. Uwalnianie DA z NAc jest regulowane przez wiele czynników hamujących i pobudzających. Glutaminergiczne drogi pobudzenia zapoczątkowane są w korze i hipokampie. Niosą one informacje o pamięci, a także emocjonalnych i psychologicznych wartościach związanych z alkoholem. Neurony hamujące jako głównego neuroprzekaźnika używają GABA [Hyman i wsp. 2006].

W uzależnieniu od alkoholu znaczną rolę wykazują neuropeptydy podwzgórza. Szczególne znaczenie zostało udowodnione dla β -endorfin, których niedobór może być przyczyną nadużywania alkoholu [Grahame i wsp. 2000, Zalewska-Kaszubska i wsp. 2008a, 2008b, Grisel i wsp. 2009]. W ostatnich latach również inne peptydy, takie jak leptyna, grelina, oreksyna czy galanina zyskały znaczenie jako potencjalnie związane z patogenezą alkoholizmu [Yildiz i wsp. 2004, Leibowitz i wsp. 2007].

Alkohol powoduje m.in. aktywację układu opioidowego, co powoduje zwiększenie uwalniania DA w NAc, najważniejszej strukturze w mezolimbicznym układzie nagrody, odpowiadającej za działanie nagradzające i pełniącej ważną rolę w rozwoju uzależnień [Herz 1997]. W wielu pracach zaznacza się znaczenie zaburzeń mezolimbicznego układu nagrody w rozwoju uzależnień oraz zmiany adaptacyjne obserwowane w jego obszarze będące skutkiem przewlekłego nadużywania alkoholu [Rudzińska i wsp. 2009].

Uwalnianie dopaminy z NAc jest pod silną hamującą kontrolą układu GABA-ergicznego. W obszarze brzuszno-polejowego jądra (VTA) wydzielanie dopaminy jest również regulowane przez neuroprzekaźniki zarówno hamujące jak i pobudzające. Neurony VTA są hamowane przez neuroprzekaźnik GABA, natomiast pobudzenie glutaminergiczne przychodzi z różnych struktur układu limbicznego [Olsen 2011].

Duże jednorazowe dawki alkoholu (*acute alcohol*) powodują zniesienie hamującego działania GABA na NAc i wyrzut dużej ilości dopaminy, co wiąże się z silnym pobudzeniem,

brakiem kontroli nad własnym zachowaniem, efektem odhamowania, a także agresją [Olsen 2011].

Podczas długotrwałego spożywania alkoholu następuje spadek aktywności receptorów GABA-A w VTA, w ten sposób znosi się hamujące działanie GABA na receptory dopaminergiczne i tym samym nasila transmisję dopaminy [Swift 2003, Johnson 2004a, Kenna i wsp. 2004a, 2004b]. Prowadzi to do silnego pobudzenia po kolejnej dużej dawce spożytego alkoholu. Przewlekłe picie prowadzi do nadpobudliwości GABA-A (a więc silniejszego hamowania) oraz hipofunkcji receptorów dopaminergicznych. Aby więc utrzymać normalną funkcję układu dopaminergicznego należy ciągle spożywać alkohol [Johnson 2004a,b,c].

W badaniach nad działaniem alkoholu po jego jednorazowym podaniu zaobserwowano wzrost poziomu β -endorfin w podwzgórzu [Popp i Erickson 1998], jądrze migdałowatym (AN, *amygdaloid nucleus*) [Lam i wsp. 2008] czy w osoczu krwi [Zalewska-Kaszubska i wsp. 2005, 2006]. Natomiast długotrwałe podawanie alkoholu prowadzi do rozwoju zmian adaptacyjnych, czego skutkiem jest spadek syntezy β -endorfin oraz ich prekursora POMC (proopiomelanokortyny) [Wilkinson i wsp. 1986, Vescovi i wsp. 1992]. Badania nad szczurami preferującymi picie alkoholu z wolnego wyboru (PR) i niepreferującymi (NP) wykazały, że podanie alkoholu szczurom powoduje znamienne wyższe uwalnianie β -endorfin u szczurów PR w porównaniu z NP [Zalewska-Kaszubska i wsp. 2005].

Podobne badania nad szczurami pochodzącymi z tzw. linii, a więc z genetyczną predyspozycją picia - WHP (Warsaw High Preferring) i brakiem predyspozycji - WLP (Warsaw Low Preferring) wykazały, że poziom β -endorfin jest wyjściowo niższy u WHP, ale po podaniu alkoholu wzrasta silniej u WHP, niż u WLP [Zalewska-Kaszubska i wsp. 2005]. Współgrało to z wynikami innych autorów, którzy stwierdzili, że u myszy ze zmniejszoną genetycznie syntezą β -endorfin spożycie alkoholu znacząco wzrastało w stosunku do kontroli [Grisel i wsp. 1999].

W okresie abstynencji, tuż po odstawieniu alkoholu, dochodzi do efektów anksjogennych i złego samopoczucia, co może mieć związek z psychologiczną potrzebą picia i powrotu do nałogu w celu wyrównania niedoboru β -endorfin.

U osób z genetyczną predyspozycją do alkoholizmu zaobserwowano znaczące obniżenie poziomu β -endorfin i ich wzmożoną produkcję w odpowiedzi na alkohol [Gianoulakis i wsp. 1996]. Stąd też, Froehlich sugerował, że badanie wpływu alkoholu na poziom β -endorfin może być markerem genetycznego ryzyka uzależnienia od alkoholu

[Froehlich i wsp. 2000]. Również w innych badaniach udowodniono udział β -endorfin w patogenezie uzależnienia od alkoholu [Zalewska-Kaszubska i wsp. 2005, 2007, Kiefer i wsp. 2006].

Jest to zgodne z obserwacjami, że podczas abstynencji alkoholowej obniżenie poziomu β -endorfin jest długotrwałe. Jego obniżenie u alkoholików stwierdzono nawet po 10 latach abstynencji [Del Arbol i wsp. 1995].

Peptydem budzącym szerokie zainteresowanie i prawdopodobnie mającym związek z piciem alkoholu jest leptyna. Badania kliniczne wykazały, że osoczowe stężenie leptyny u hospitalizowanych alkoholików jest wyraźnie wyższe niż u zdrowych ochotników [Kiefer i wsp. 2001, Nicolas i wsp. 2001]. Wykazano także, pozytywną korelację między poziomem leptyny, a pojawieniem się silnych objawów odstawienia w pierwszych dniach abstynencji. Również późniejsze badania potwierdzają wpływ zwiększonego stężenia leptyny skorelowanego z objawami odstawienia, głodem alkoholowym oraz przymusem picia u osób uzależnionych [Kraus i wsp. 2004, Hillemacher i wsp. 2006]. Ostatnio stwierdzono, że istnieje silny związek pomiędzy poziomami leptyny a wysokimi wartościami na skalach mierzących objawy zaburzeń obsesyjno-kompulsywnych u alkoholików [Lenz i wsp. 2010].

Interesujące są również badania nad rolą NPY w uzależnieniu od alkoholu. Badania przeprowadzone na szczurach preferujących (PR) i niepreferujących (NP) picie alkoholu wykazały, że zwierzęta z linii PR wykazują wyraźnie niższe stężenie NPY w AN, podwzgórzu i korze czołowej [Ehlers i wsp. 1998]. U zwierząt preferujących alkohol wykazano polimorfizm genu kodującego NPY, który może być odpowiedzialny za zmieniony poziom NPY [Spence i wsp. 2005]. Stwierdzono również, że myszy z genetycznym brakiem NPY (NPY^{-/-}) przyjmują większe ilości etanolu, niż myszy typu dzikiego i są bardziej odporne na jego sedatywne działanie. Natomiast myszy z nadekspresją genu NPY, przyjmują mniejsze ilości etanolu oraz wykazują większą wrażliwość na jego działanie sedatywne [Thiele i wsp. 1998]. Obserwacje te sugerują istnienie odwrotnej korelacji między aktywnością NPY, a konsumpcją etanolu. Potwierdzają to również badania przeprowadzone na dwóch liniach szczurów preferujących alkohol, w których wykazano zmniejszenie spożycia alkoholu po podaniu NPY do komór mózgu [Badia-Elder i wsp. 2001, 2003]. Ponadto u szczurów przewlekłe pijących alkohol, w okresie jego odstawienia, zaobserwowano obniżoną ekspresję NPY w korze mózgowej, AN oraz w podwzgórzu [Roy i Pandey 2002].

Do innych peptydów badanych pod kątem udziału w mechanizmach uzależnieniowych możemy zaliczyć galaninę. Z badań laboratoryjnych wynika, że spożywanie alkoholu wpływa

na poziom galaniny w podwzgórzu [Leibowitz i wsp. 2003]. U szczurów obu płci otrzymujących etanol dootrzewnowo, jak i u tych, które piły alkohol w warunkach wolnego wyboru, zaobserwowano zwiększoną ekspresję mRNA dla galaniny w jądrze grzbietowo-przyśrodkowym i przykomorowym podwzgórza. Poziom mRNA zmniejszał się natomiast w czasie odstawienia alkoholu podtrzymanego przez podawanie naloksonu, antagonisty receptorów opioidowych. Iniekcje naloksonu powodowały wyraźny spadek ekspresji mRNA galaniny u szczurów pijących alkohol, ale nie u szczurów pijących wodę. Sugeruje to jednoczesne zaangażowanie galaniny i opioidów w spożywanie alkoholu [Leibowitz i wsp. 2003].

Ciekawe efekty badań związku pепatydów z działaniem alkoholu dotyczą również oreksyn. Badania doświadczalne wykazały, że są one zaangażowane w behavior poszukiwania bodźca nagradzającego przez zwierzęta uzależnione od środków odurzających m.in. alkoholu [Lawrence i wsp. 2006]. W badaniach przeprowadzonych na liniach szczurów preferujących alkohol stwierdzono, że po dootrzewnowym podaniu SB334867, antagonisty receptora oreksynowego OX1-R, zwierzęta znajdujące się w sytuacji, która poprzednio wiązała się z dostępnością alkoholu, nie przejawiały zachowań aktywnego poszukiwania alkoholu. Pod wpływem antagonisty receptora oreksynowego nastąpiło zniesienie przymusu picia u badanych szczurów. Ponadto u tych zwierząt wykazano zwiększoną ekspresję mRNA dla oreksyn w bocznej części podwzgórza [Lawrence i wsp. 2006].

W innych badaniach, na szczurach preferujących alkohol etylowy zaobserwowano, że w czasie jego przyjmowania stężenie CRH w AN zwierząt jest obniżone [Ehlers i wsp. 1992]. Natomiast w okresie abstynencji stężenie tego peptydu zwiększa się w okresie do 12 godzin po odstawieniu alkoholu [Pich i wsp. 1995]. Zaobserwowano również, że obniżonemu stężeniu CRH w trakcie spożywania alkoholu towarzyszy sensytyzacja receptorów CRH [Ehlers i wsp. 1992]. Wyniki tych badań sugerują, że przeciwłękowe działanie alkoholu może być związane z supresją systemu CRH, a zachowania lękowe towarzyszące odstawieniu alkoholu są spowodowane nadczynnością tego systemu. Podanie antagonisty receptorów CRH-1 znosiło zachowania lękowe wywołane u badanych zwierząt odstawieniem alkoholu. Sugeruje to istotną rolę receptora CRH-1 w wystąpieniu zachowań lękowych związanych z abstynencją oraz w pośredniczeniu w nadmiernym spożywaniu alkoholu przez zwierzęta uzależnione [Overstreet i wsp. 2004].

1.2. Farmakoterapia alkoholizmu

Stosowane dotychczas leki takie jak disulfiram, bazują na efektach awersyjnych związanych z kojarzeniem picia z nieprzyjemnym doświadczeniem i ograniczaniu picia na skutek wytworzenia lęku przed jego negatywnymi skutkami. Metody te są jednak obecnie uznawane za nieetyczne i niebezpieczne, coraz częściej też podnosi się ich ograniczoną skuteczność [Keung 2003, Schuckit 2009].

Niektórzy autorzy postulują łączenie odpowiedniej typologii lub psychobiologicznych modeli konieczności picia alkoholu z odpowiednim leczeniem farmakologicznym [Addolorato i wsp. 2005, Soyka i wsp. 2008]. U pacjentów, u których przeważa konieczność uzyskania przyjemności z picia alkoholu, co łączy się z zaburzeniami układu dopaminergicznego i opioidowego, postuluje się leczenie naltreksonem - antagonistą receptorów opioidowych. U pacjentów z silną potrzebą osiągnięcia spadku napięcia psychicznego (konieczność relaksu), spowodowana zaburzeniami GABA i aktywnością układu glutaminianergicznego, postuluje się stosowanie akamprozatu lub baklofenu (agonisty GABA-B). Natomiast u chorych z obsesyjnym pragnieniem picia (wywołanym utratą samokontroli), prawdopodobnie spowodowanym zbyt niskim stężeniem 5-HT, leczenie powinno opierać się na stosowaniu SSRI (selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny – np. fluoksetyna, sertralina), baklofenu czy topiramatu [Addolorato i wsp. 2005, Soyka i wsp. 2008].

Należy jednak podkreślić, że jak do tej pory brak jest skutecznego i bezpiecznego leku do leczenia alkoholizmu, a poszukiwanie nowych leków przeciwalkoholowych trwa nadal.

1.2.1. Naltrekson (NAL)

W licznych badaniach zaznacza się udział układu opioidowego w nagradzającym działaniu alkoholu [Hill i wsp. 2010]. NAL jest antagonistą receptorów opioidowych – w przeciwieństwie do naloksonu, który się nie wchłania z przewodu pokarmowego, NAL może być stosowany drogą doustną. Na podstawie wielu klinicznych badań stwierdzono, że środek ten ma zdolność działania “antyalkoholowego” poprzez wydłużanie okresu abstynencji u ludzi [Mason 2003, McGeary i wsp. 2006, Kiefer i wsp. 2007], choć znane są też zaskakujące dane o wręcz przeciwnym działaniu tego związku, za co mógłby odpowiadać polimorfizm genów związanych z układem opioidowym [McGeary i wsp. 2006].

W licznych, cytowanych wyżej badaniach nad działaniem NAL, stwierdzono ograniczenie spożycie alkoholu przez pacjentów leczonych tym lekiem – równocześnie wykazuje on jednak wiele działań ubocznych: widoczne objawy zespołu odstawienia, nudności, hepatotoksyczność, zaburzenia nastroju oraz znużenie - mogą to być czynniki ograniczające jego stosowanie [Mason 2003].

NAL, jako antagonist receptorów opioidowych, ma również wpływ na poziomy endogennych opioidów. Podanie NAL znacząco obniża picie u zwierząt preferujących, co pozostaje w związku z udziałem β -endorfin w uzależnieniu od alkoholu [Grahame i wsp. 2000]. Przewlekłe stosowanie NAL powoduje bowiem spadek spożycia etanolu przy jednoczesnym wzroście endogennych β -endorfin [Zalewska-Kaszubska i wsp. 2008a, 2008b]. Taki mechanizm może być powiązany z działaniem wyrównującym niedobór β -endorfin w abstynencji alkoholowej [Rudzińska i wsp. 2009].

1.2.2. Akamprozat (AC)

AC należy do nowej generacji leków stosowanych w leczeniu alkoholizmu u ludzi [Lesch i wsp. 2001, Mason 2003]. Większość doniesień potwierdza jego skuteczność jako środka farmakologicznego pozwalającego utrzymywać abstynencję w dłuższym okresie czasu oraz zmniejszać ilość spożywanego alkoholu przez osoby uzależnione. Uważa się obecnie, że jego działanie przede wszystkim związane jest z układem pobudzających aminokwasów, a zwłaszcza z oddziaływaniem poprzez receptory glutaminianergiczne typu NMDA czy metabotropowe typu 5 (tzw. mGluR5) [Mann i wsp. 2008]. Ponadto, AC wykazuje podobieństwo strukturalne do neurotransmitera GABA i prawdopodobnie wchodzi w reakcję z GABA-A [Pierrefiche i wsp. 2004]. Należy jednak podkreślić, iż dokładny mechanizm działania tego leku jest jak dotąd niezbyt jasny i ciągle stanowi przedmiot wielu badań [Chau i wsp. 2010].

Również, podobnie jak w przypadku NAL, przewlekłe stosowanie AC powoduje spadek spożycia etanolu przez szczury przy jednoczesnym wzroście poziomu endogennych β -endorfin [Zalewska-Kaszubska i wsp. 2008a, 2008b]. Taki mechanizm może mieć związek z działaniem wyrównującym niedobór β -endorfin w czasie abstynencji alkoholowej [Rudzińska i wsp. 2009].

1.3. Środki pochodzenia roślinnego

Jak do tej pory brak skutecznych leków stosowanych w leczeniu alkoholizmu, dlatego równolegle poszukuje się leków roślinnych. Wyniki badań przeprowadzonych z użyciem różnych środków pochodzenia roślinnego wykazały pewną ich skuteczność w ograniczeniu spożycia alkoholu, a także w leczeniu symptomów zespołu odstawienia [Mikołajczak 2006]. Niektóre środki roślinne wykazują również działanie utrzymujące abstynencję u pacjentów oraz ograniczają skutki tego odstawienia. Jednym z bardziej obiecujących preparatów pochodzenia roślinnego jest wyciąg z ołownika łąkowego - kudzu (KU) oraz zawarte w nim izoflawonoidy pueraryna (PUE) i daidzyna (DAI) [Mikołajczak i wsp. 2009].

1.3.1. Kudzu (KU)

Pueraria lobata, czyli ołownik łąkowy należy do rodziny Motylkowatych (*Fabaceae*). Jest to wieloletnia roślina pnąca, występująca we Wschodniej Azji (Chiny, Japonia, Korea). W tradycyjnej medycynie chińskiej roślina ta jest używana jako środek napotny, przeciwgorączkowy, przeciwwymiotny, przeciwbiegunkowy i mlekopędny. Odwary stosowano w przeziębieniach, czerwonce, odrze, w bólach szyi i oczu [Shebek i Rindone 2000].

Na podstawie doniesień pochodzących z naturalnej medycyny chińskiej, zaproponowano zastosowanie KU jako środka przeciwko zatruciom alkoholowym, w celu ograniczenia nadmiernego spożycia alkoholu w chronicznym alkoholizmie oraz w znoszeniu negatywnych skutków zespołu odstawienia. W badaniach stosowano zarówno ekstrakty z korzenia (*Radix puerariae*) jak i kwiatu (*Flos puerariae*) [Lin i wsp. 1996, Keung i Vallee 1998].

Za aktywną grupę związków w tej roślinie uważa się izoflawonoidy. Wiele z nich występuje w postaci barwników, we wszystkich organach roślinnych. Z rośliny *Pueraria lobata* wyodrębniono i oznaczono następujące izoflawonoidy: PUE (160 mg/g ekstraktu), DAI (22 mg/g ekstraktu), genistynę (3,7 mg/g ekstraktu), daidzeinę (2,2 mg/g ekstraktu), 4',7-diglukozyd daidzeiny – (1,2 mg/g), genisteinę – (0,2 mg/g), formonoteinę – (0,16 mg/g) [Keung i Vallee 1998].

Udowodniono, że za działanie zmniejszające picie alkoholu odpowiedzialne są głównie 3 składniki ekstraktu: DAI, daidzeina oraz PUE, przy czym największą skuteczność wykazywała DAI [Benlhabib i wsp. 2004]. Redukcję spożycia alkoholu oraz ograniczenie

negatywnych symptomów zespołu abstynencyjnego wykazano na zwierzęcych modelach doświadczalnych [Keung i Vallee 1998, Keung 2003].

W badaniach wpływu KU na układ enzymatyczny wątroby wykazano, że ogranicza on hepatotoksyczność etanolu poprzez wpływ na enzymy metabolizujące etanol [Kim i wsp. 2002]. Udowodniono, że składniki czynne ekstraktu mogą wpływać ograniczająco na spożycie etanolu poprzez modulowanie aktywności GABA oraz NMDA, a także przez hamowanie aktywności kanałów wapniowych [Overstreet i wsp. 2003]. Jak do tej pory nie udało się ustalić mechanizmu tego działania, ani stwierdzić ich działania ośrodkowego. Być może mechanizmy działania ekstraktu z KU są związane ze zmianami biochemicznymi na obwodzie, na przykład zmianami w składzie białek osoczowych, co powoduje pośrednie oddziaływanie na OUN [Bandyopadhyay i wsp. 1998, Poddar i wsp. 2000, Keung 2003].

W jednym z pierwszych badań klinicznych na 38 ochotnikach, 21 osobom podawano KU. Mimo wcześniejszych obiecujących wyników na zwierzętach, nie udało się udowodnić korzystnego działania ekstraktu u pacjentów [Shebek i Rindone 2000]. W innych badaniach przeprowadzonych na 14 ochotnikach „*heavy drinkers*” stwierdzono, że 7-dniowe podawanie preparatu zawierającego 500 mg KU prowadziło do ok. 40% zmniejszenia ilości wypijanego alkoholu (w tym przypadku piwa) przez uczestników badania, nie dając działań ubocznych [Lucas i wsp. 2005]. W ostatniej pracy przeprowadzonej na 12 ochotnikach o umiarkowanym spożyciu alkoholu (7 drinków/tydzień) stwierdzono, że podawanie przez 9 dni KU (750 mg całkowitej ilości izoflawonoidów/dobę) nie powodowało żadnych negatywnych skutków krążeniowych, czy kognitywnych, co miałyby świadczyć o bezpieczeństwie jego stosowania [Penetar i wsp. 2011].

1.3.2. Daidzyna (DAI)

DAI jest głównym, aktywnym składnikiem KU. Badania potwierdzające jej farmakologiczną skuteczność zostały przeprowadzone na modelach zwierzęcych. Podawano chomikom rasy syberyjskiej alkoholowy ekstrakt z korzenia w dawce 1500 mg/kg m.c./dobę i stwierdzono ograniczenie spożycia alkoholu przez zwierzęta o 50% [Keung 2003]. Badania przeprowadzone na szczurach wykazały skuteczność tego ekstraktu już w dawce 500 mg/kg m.c./dobę [Benlhabib i wsp. 2004].

DAI działa prawdopodobnie jako selektywny i skuteczny inhibitor dehydrogenazy aldehydowej (ALDH-2) obecnej w mitochondriach. W badaniach na chomikach, porównujących działanie DAI z działaniem disulfiramu, jako nieodwracalnego inhibitora

ALDH wykazano, że podawanie DAI w dawce powodującej ograniczenie spożycia etanolu o 50% nie ma wpływu na metabolizm etanolu i aldehydu octowego, a więc mechanizm działania awersyjnego jest rozbieżny z działaniem disulfiramu [Keung i wsp. 1995].

DAI jako inhibitor ALDH-2 może redukować picie etanolu poprzez zaburzenie metabolizmu monoamin takich jak 5-HT czy DA. Przypuszcza się, że DAI hamuje proces przemiany aldehydów w kwasy, w mitochondriach wątrobowych [Rezvani i wsp. 2003]. Rezultaty szczegółowych badań z użyciem syntetycznych analogów amin i ich pochodnych pozwoliły stwierdzić, że miejscem działania DAI jest szlak MAO - ALDH-2 oraz, że biogeny aldehyd powstający w wyniku enzymatycznej aktywności MAO bierze udział w regulacji picia etanolu u zwierząt doświadczalnych [Xie i wsp. 1994, Keung 2003]. Aktywność tylko na obwodzie prowadzi więc prawdopodobnie do zwiększenia ilości metabolitów aldehydowych monoamin, które przechodząc przez barierę krew-mózg łączą się tam z aminami tworząc silnie pobudzające kondensaty (np. salsolinol), co ma kompensować pewne niedobory tych związków u szczurów preferujących [McBride i wsp. 2002].

1.3.3. Pueraryna (PUE)

Jest to glikozydowy izoflawonoid, występujący w KU w największej ilości i stanowiący ok. 90% wszystkich jego izoflawonoidów. Udowodniono, że działanie przeciwalkoholowe PUE jest chwilowe, w przeciwieństwie do działania całego ekstraktu z korzenia KU. W badaniach Lina i wsp. wykazano, że w dawce od 30-300 mg/kg m.c./dobę zaobserwowano spadek picia alkoholu o 32% - 65% [Lin i wsp. 1996]. Efektem działania PUE jest zmniejszenie negatywnych skutków zespołu odstawienia. Istnieją poglądy, że podobnie jak DAI, PUE nie przenika do mózgu, stąd wykazuje swoje działanie poprzez mechanizmy pośrednie [Benlhabib i wsp. 2004].

W badaniach *in vitro* stwierdzono, że PUE wywołuje zmiany w aktywności receptorów opioidowych, GABA-A i NMDA w mózgu [Overstreet i wsp. 2003]. Wpływ na receptory NMDA i GABA-ergiczne jest różny i zależy od dawki. Etanol w dużych jednorazowych dawkach jest słabym antagonistą receptorów NMDA i nasila działanie hamujące receptorów GABA. W przypadku przewlekłego picia alkoholu działanie jest odmienne: następuje nasilenie działania receptorów NMDA i wzrost ich liczby w hipokampie. Jego uszkodzenie odpowiedzialne jest za problemy z pamięcią i uczeniem się. W ten sposób można też tłumaczyć wzrost pobudliwości OUN po odstawieniu alkoholu. W przypadku oddziaływania na receptory GABA, etanol znosi hamujący wpływ GABA i w ten sposób

następuje wzrost pobudliwości układu nerwowego, drgawki i inne objawy zespołu odstawienia [Kostowski, Herman 2003].

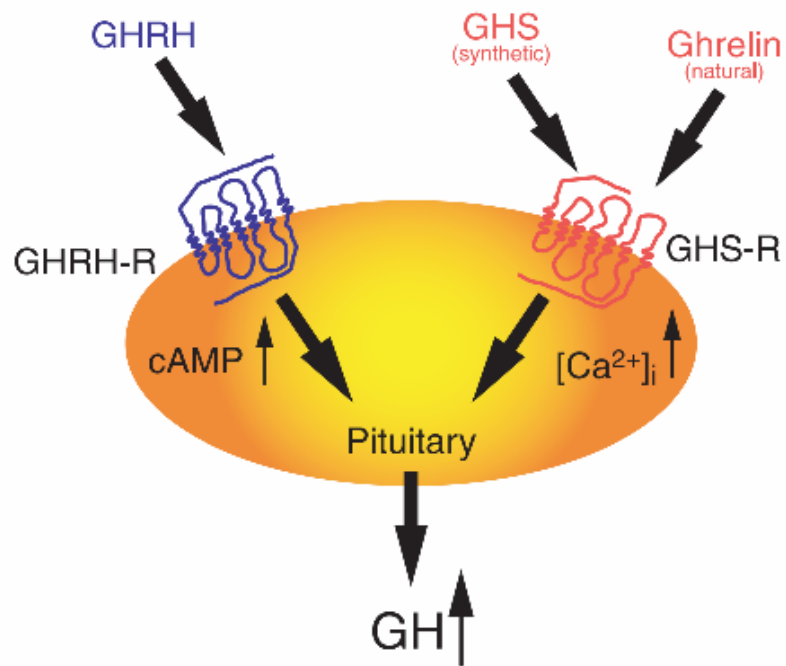
Jednym z możliwych mechanizmów działania PUE, jest jej działanie znoszące negatywne efekty odstawienia oraz działanie przeciwłękowe w zespole odstawienia, prawdopodobnie poprzez receptory benzodiazepinowe [Overstreet i wsp. 2003]. PUE może także mieć modulujący wpływ na kanały wapniowe. Wiadomo, że zastosowanie inhibitorów kanałów wapniowych może zmniejszać niektóre efekty zespołu odstawienia [Overstreet i wsp. 2003]. Etanol bowiem w dużych, pojedynczych dawkach powoduje skrócenie czasu otwarcia kanałów wapniowych zależnych od potencjału typu L, hamując w ten sposób ich działanie i powodując w ten sposób działanie depresyjne na OUN. Natomiast długotrwałe spożywanie etanolu powoduje zwiększenie aktywności oraz liczby kanałów wapniowych typu L. Konsekwencją tego jest większe uwalnianie neuroprzekaźników oraz wzrost pobudliwości neuronów, wzmożone działanie receptorów NMDA, a osłabienie działania receptorów GABA-A, co może być przyczyną powstawania drgawek w zespole odstawienia [Kostowski i Herman 2003].

Wydaje się więc, że PUE działając przeciwko objawom odstawienia wykazuje działanie ośrodkowe, wbrew postulatam proponowanym przez Benlhabib i wsp. [Overstreet i wsp. 2003, Benlhabib i wsp. 2004].

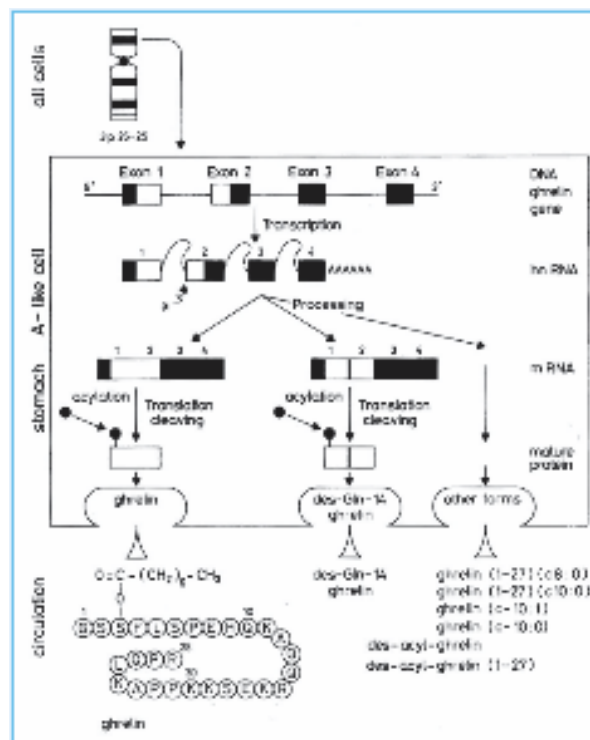
1.4. Grelina

1.4.1. Struktura, receptor i geny

W roku 1998 Bowers odkrył syntetyczny heksapeptyd (heksarelinę), silny stymulant uwalniania hormon wzrostu (GH). Nazwał go GHRP (*growth hormone releasing peptide*). Dalsze badania doprowadziły do odkrycia kolejnych związków syntetycznych – grupę tę nazwano GHS (*growth hormone secretagogues*). Nieznany jeszcze receptor dla tych związków nazwano GHS-R (*orphan growth hormone secretagogue receptor*) [Smith i wsp. 1997, Bowers i wsp. 1998, Karydis i wsp. 1998, Dickson i wsp. 1999, Ghigo i wsp. 1999]. Udowodniono, że wszystkie te związki działają przez rodzinę białek G [Howard i wsp. 1996, Pong i wsp. 1996, Korbonits i wsp. 1999]. W następstwie tych odkryć, obowiązująca do tej pory teoria, że jedynym czynnikiem uwalniającym GH jest somatoliberyna (GHRH) przestała być aktualna (Ryc.1.).



Ryc. 1. Receptory dla wydzielania GH oraz różne związki je pobudzające [wg Kojima i Kangawa, 2005].



Ryc. 2. Grelina jest kodowana przez pierwsze dwa eksony. Unikalne jest, że w procesie przetwarzania hnRNA (pre-mRNA) powstają dwie niezależne cząsteczki mRNA, dając początek formom greliny o różnej strukturze [wg Casseneuve i wsp. 2004].

Ponieważ GHS są grupą związków syntetycznych, a wykazują działanie uwalniające GH, rozpoczęto poszukiwania związków endogennych działających w ten sam sposób [Smith i wsp. 1996, 1999a, 1999b, Robinson i wsp. 1997].

W 1999 roku, nowo wyizolowany przez zespół Kojima & Hosoda, 28-aminokwasowy peptyd nazwany został greliną i uznano go za endogenne ligand dla GHS-R1a, czyli receptora grelinowego (*ghrelin growth hormone secretagogue receptor 1a*) [Kojima i wsp. 1999, 2001]. Strukturalnie, receptor dla greliny jest najbardziej zbliżony i w 52% identyczny do receptora dla motyliny [McKee i wsp. 1997, Feighner i wsp. 1999]. Istnieje również podobieństwo funkcjonalne – oba peptydy są zaangażowane w prawidłową pracę żołądka.

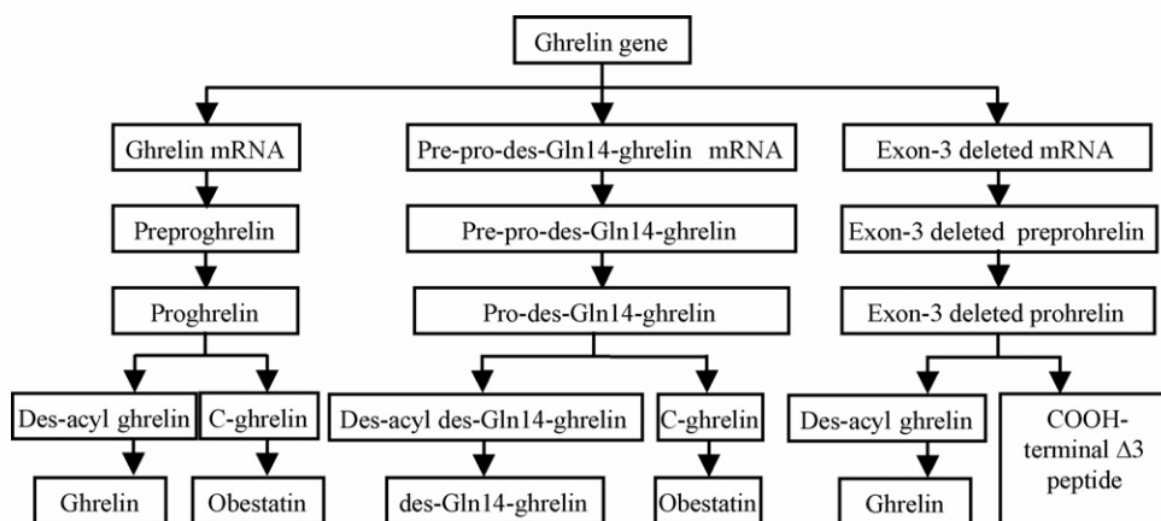
Grelina powstaje z prekursora, 117-aminokwasowej preprogreliny kodowanej przez gen GHRL [Castaneda i wsp. 2010, Delzenne i wsp. 2010] (Ryc. 2.). Jej obecność została stwierdzona u wszystkich kręgowców. U ludzi gen ten występuje na chromosomie trzecim (3p25-26). Proteoliza preprogreliny prowadzi do powstania 23-aminokwasowej sekwencji sygnałowej i 94-aminokwasowej progreliny. Następnie prohormon ulega modyfikacji przez grelinową O-acetylotransferazę (GOAT), która przyłącza grupę oktanylową do seryny w pozycji trzeciej łańcucha peptydowego. Po modyfikacji następuje enzymatyczne cięcie prohormonu przez proteazę PC1/3 w pozycji Arg28/Ala29 do 28-aminokwasowej, N-końcowej cząsteczki aktywnej greliny [Castaneda i wsp. 2010, Nikolopoulos i wsp. 2010b, Polińska i wsp. 2011].

Główną formą greliny w ludzkim organizmie jest 28-aminokwasowy peptyd z n-oktanoylową modyfikacją na Ser3 (grelina 1-28), ze względu na istnienie różnych szlaków dla syntezy greliny, powstają również mniej istotne pochodne, takie jak:

- dekanoylowa grelina (1-28),
- decenoylowa grelina (1-28),
- oktanoylowa grelina (1-27),
- decanoylowa grelina (1-27).

Wszystkie te formy występują zarówno we krwi jak i w ścianie żołądka [Hosoda i wsp. 2003]. Dalsze badania wykazały istnienie innych izoform greliny, min. des-Gln14-greliny, powstającej ze 117-aminokwasowej prepro-des-Gln14-greliny [Hosoda i wsp. 2000b]. Powstaje ona w alternatywnym splicingu genu dla greliny i charakteryzuje się delecją aminokwasu Glu w pozycji 14 łańcucha polipeptydowego [Polińska i wsp. 2011]. Dalsze przemiany dają postać zacylowaną, która podobnie jak podstawowa forma zacylowanej greliny działa na receptor GHS-R1a, zwiększając ekspresję genów dla GHS-R1a w komórkach żołądka i stężenia GH w surowicy [Hosoda i wsp. 2000b].

Receptory dla greliny należą do rodziny białek G i największą ich gęstość obserwuje się w osi podwzgórze-przysadka, ale można je znaleźć również w trzustce, nerkach, tkance tłuszczowej, jajnikach, mięśniu sercowym i naczyniach krwionośnych [Rak i Gregoraszcuk 2009a, Suzuki i wsp. 2009]. Uważa się, że pokrewnym do greliny peptydem jest obestatyna, powstająca w tym samym procesie, co grelina i mająca również hamujący wpływ na apetyt [Zhang i wsp. 2005] (Ryc. 3). W ten sposób współdziała z podstawową formą greliny i utrzymuje dodatni bilans energetyczny, stymulując pobieranie pokarmu i oszczędzając zużycie tkanki tłuszczowej [Cumings i wsp. 2006].



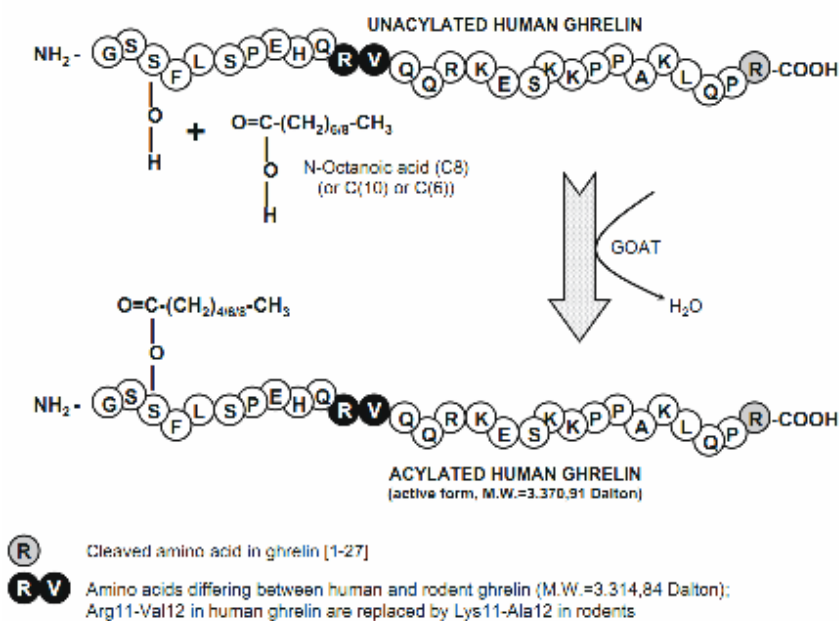
Ryc. 3. Kolejne etapy powstawania greliny oraz jej pochodnych [wg Soares i wsp. 2008].

1.4.2. Podstawowe formy greliny

Poprzez analizę struktury chemicznej oraz aktywności biologicznej, wyróżniono dwie podstawowe formy molekularne greliny: zacylowaną (która ma przyłączoną grupę oktanylową do seryny w pozycji trzeciej łańcucha peptydowego) oraz desacylowaną grelinę (nie posiadającą takiej modyfikacji), stanowiącą ponad 80% całkowitej ilości greliny we krwi [Adams i wsp. 2011] (Ryc. 4).

Unikalna, potranslacyjna modyfikacja, o-acylacja w pozycji Ser-3 jest kluczowa dla wiązania się greliny z receptorem GHS-R1a – forma desacylowana nie posiada takiej modyfikacji i nie wykazuje aktywności receptorowej wobec GHS-R1a [Hosoda i wsp. 2000b, Gutierrez i wsp. 2008, Yang i wsp. 2008b]. Donosi się również o innych możliwych

receptorach, gdzie może oddziaływać zarówno grelina w postaci aktywnej jak i nieaktywnej, jednak w chwili obecnej brak jednoznacznych danych [Soares i wsp. 2008].



Ryc. 4. Podstawowe formy greliny w organizmie człowieka [wg Castaneda i wsp. 2010].

Acylowana grelina jest uwalniana z komórek okładzinowych, głównie w dnie żołądka (*X/A-like cells*), w mniejszych ilościach z jelita cienkiego i grubego oraz z innych tkanek takich jak trzustka, płuca czy serce. U szczurów jest to około 80%, a u ludzi 65% całkowitej produkcji aktywnej greliny. Proporcje pomiędzy formą aktywną a nieaktywną na tym etapie wynoszą 1:2 [Hosoda i wsp. 2003]. Poziom greliny w żołądku jest kilkakrotnie wyższy niż w surowicy, lecz gwałtownie spada podczas głodzenia na skutek jej wydzielenia do krwi.

Enzymy acylujące grelinę nie zostały jak do tej pory zidentyfikowane. Zaobserwowano udział kwasów tłuszczowych i trigliceroli o średniej długości w acylacji greliny [Nishi i wsp. 2005]. Wzrost lipofilności cząsteczki greliny po acylacji tłumaczy, dlaczego acylowana grelina krąży we krwi w połączeniu z dużymi cząsteczkami lipoprotein, głównie z HDL. Takie wiązanie osłabia jej aktywność biologiczną i zdolność do wiązania się z receptorem [Beaumont i wsp. 2003, De Vriese i wsp. 2007]. Forma desacylowana greliny krąży we krwi w postaci niezwiązanej [Perbani S. i Inui A. 2010].

Desacylacja greliny odbywa się w surowicy i odpowiada za przerwanie jej działania. W procesie tym biorą udział związane z HDL enzymy, a mianowicie: paraoksonaza obecna w surowicy oraz działające w żołądku butyrylocholinoesteraza, lizofosfolipaza I i tioesteraza

aktywna wobec palmitoyl-Gsa i palmitoyl-CoA [Bluet-Pajot i wsp. 1998, Asakawa i wsp. 2001, Beaumont i wsp. 2003].

Okres półtrwania acylowanej greliny wynosi 9-13 minut, a formy desacylowanej 27-31 minut [Abizaid i wsp. 2006].

Forma desacylowana występuje we krwi i w żołądku w ilości ok. 10 razy większej niż acylowana forma aktywna [Hosoda i wsp. 2000b]. Wykazuje ona również większą trwałość, co przekłada się na mierzalne proporcje między obiema formami greliny w oznaczeniach we krwi. Grelina w surowicy, jako jeden z nielicznych peptydów wiąże się z HDL. Ponieważ kwasy tłuszczowe wiążą się z greliną wiązaniem estrowym przez Ser-3, stąd paraoksonaza – ważny enzym przemian lipidowych i potencjalna esteraza może być zaangażowana w desacylację aktywnej greliny.

W badaniach nad formą „nieaktywną” nie stwierdzono, aby desacylowana grelina wypierała z połączeń z receptorem znakowaną acylowaną grelinę w podwzgórzu i przysadce. Nie wpływa również na uwalnianie GH. Nie oznacza to jednak, że nie posiada ona żadnej aktywności – nadal trwają poszukiwania jej znaczenia fizjologicznego i receptora dla tej formy.

Wykazano pewną aktywność biologiczną desacylowanej greliny. Wiadomo, że duże stężenie acylowanej greliny powoduje szybki wzrost poziomu glukozy i insuliny we krwi [Granata i wsp. 2010, Nikolopoulos i wsp. 2010b]. Takiego efektu nie obserwujemy przy wzroście greliny całkowitej w osoczu u ludzi - można zatem wnioskować, że forma desacylowana greliny ma działanie antagonistyczne z punktu widzenia metabolicznego, a nie receptorowego. Również, w badaniach na szczurach stwierdzono, że forma desacylowana może mieć pewne antagonistyczne działanie wobec greliny aktywnej, ponieważ jej podanie dootrzewnowe lub centralne hamowało przyjmowanie pokarmów - działanie to prawdopodobnie zachodzi przez jądro łukowate (NARC) i jądro przykomorowe (PVN) w hipokampie [Chen i wsp. 2005]. U myszy transgenicznych ze zwiększoną produkcją desacylowanej greliny stwierdza się słabsze pobieranie pokarmów i niską masę ciała [Asakawa i wsp. 2005, Chen i wsp. 2005, Inhoff i wsp. 2008]. Są również badania wykazujące przeciwny efekt [Gauna i wsp. 2005, Heijboer i wsp. 2006], lub jego brak [Toshinai i wsp. 2006], w związku z tym kwestia ta wymaga dalszych badań.

Poza tym obecność obu izoform greliny znacząco poprawia wrażliwość tkanek na insulinę [Polińska i wsp. 2011]. Forma desacylowana posiada prawdopodobnie pewne działanie kardioprotekcyjne oraz antyproliferacyjne oraz nasila adipogenezę [Cassoni i wsp. 2001], jednak jej działanie receptorowe jak do tej pory nie jest znane.

1.4.3. Komórkowy mechanizm działania greliny

Grelina wykazuje dwa pośrednie mechanizmy działania komórkowego, w których dochodzi do zwiększenia poziomu Ca^{2+} . Po pierwsze zwiększa jego stężenie poprzez cyklazę adenylową i kinazę proteinową A (AC-PKA) w komórkach wykazujących ekspresję NPY w NAc [Kohno i wsp. 2003]. Drugi mechanizm polega na oddziaływaniu na szlak związany z fosfokinazą C i kinazą proteinową C (PLC-PKC) [Chen i wsp. 1996]. Postuluje się obecność dwóch różnych miejsc wiązania na receptorze dla greliny, co może tłumaczyć równoczesne istnienie tych dwóch mechanizmów [Cassoni i wsp. 2001].

Istnieje też trzeci mechanizm działania, związany bezpośrednio ze zwiększeniem pobierania pokarmu na skutek głodzenia, związany z pobudzeniem aktywowanej przez AMP kinazy proteinowej (AMPK) i acetylo CoA karboksylazy (ACC) oraz hamowaniem aktywności syntazy kwasów tłuszczowych (FAS) w jądrze podwzgórza brzuszno-bocznym, uznawanym za ośrodek odczuwania sytości [Lopez i wsp. 2008].

Grelina hamuje również zapalenie naczyń poprzez aktywację zależnej od kalmoduliny kinazy (CaMKK), aktywowanej przez AMP kinazy proteinowej (AMPK), i śródbłonkowej syntazy NO (eNOS) [Xu i wsp. 2008].

Udało się sklonować również receptor GHSR-1b, ale jego rola jak do tej pory nie jest znana, nie wiążą się też do niego żadne znane peptydy [Howard i wsp. 1996, Smith i wsp. 1999, Gnanapavan i wsp. 2002].

1.4.4. Rola greliny w organizmie

Komórki uwalniające grelinę znajdują się przede wszystkim w żołądku i jelitach, ale zostały znalezione również w trzustce [Volante i wsp. 2002a, Prado i wsp. 2004, Ueberberg i wsp. 2009], płucach [Volante i wsp. 2002b, Ueberberg i wsp. 2009], w ścianie naczyń krwionośnych i komorach serca, nerkach (skorelowana z poziomem kreatyniny) [Mori i wsp. 2000, Ueberberg i wsp. 2009], limfocytach [Hattori i wsp. 2001], łożysku [Gualillo i wsp. 2001, Ueberberg i wsp. 2009], jądrach [Tena-Sempere i wsp. 2002, Ueberberg i wsp. 2009], jajnikach [Gaytan i wsp. 2003, Ueberberg i wsp. 2009] i mózgu (podwzgórze i kora) [Hosoda i wsp. 2000a, Cowley i wsp. 2003, Hou i wsp. 2006, Ueberberg i wsp. 2009].

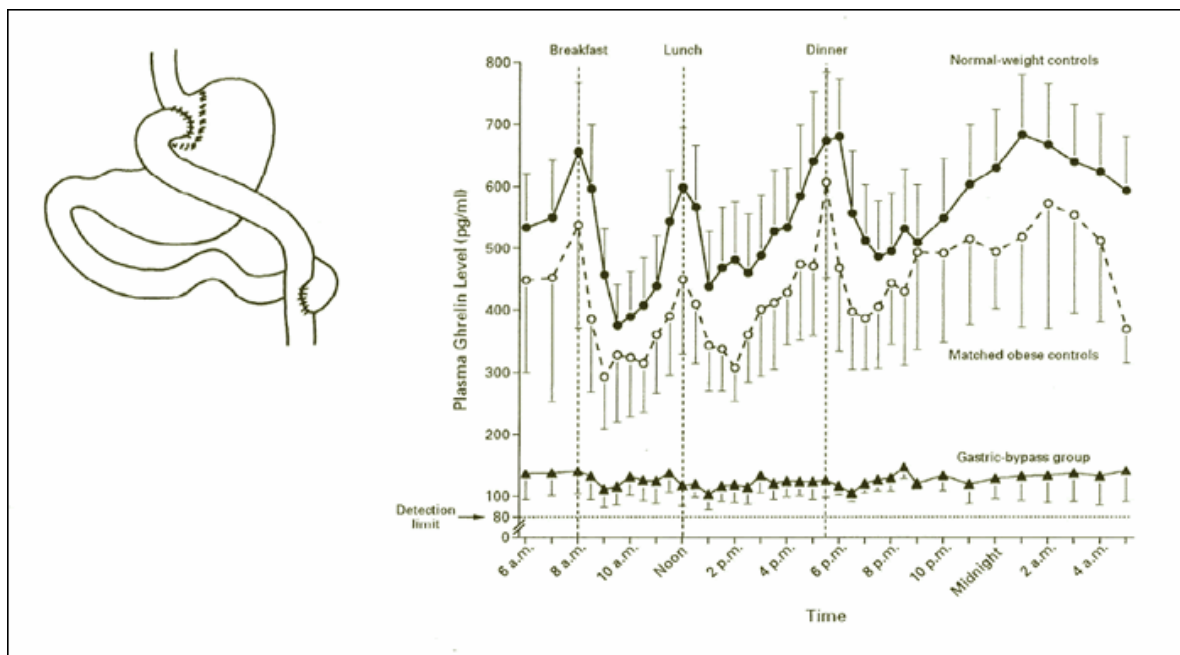
Grelina posiada działanie wielokierunkowe. Przede wszystkim zwiększa wydzielanie GH i nasila apetyt [Shiia i wsp. 2002]. Poza tym reguluje proces proliferacji komórek

[Yoshihara i wsp. 2002], stymuluje również wydzielanie prolaktyny i hormonów adrenokortykotropowych [Kojima i wsp. 2004], nasila sen wolnofalowy [Weikel i wsp. 2003] i proces uczenia się [Carlini i wsp. 2002], a w żołądku wpływa na proces wydzielania kwasu żołądkowego i procesy ochronne ściany [Brzozowski i wsp. 2004]. Odgrywa również ważną rolę w układzie immunologicznym - receptory dla greliny stwierdzono na limfocytach T i B [Yada i wsp. 2006]. Zaobserwowano też działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne, hamowanie ekspresji IL-1 β , IL-6 i TNF α przez limfocyty i monocyty [Li i wsp. 2004, El Eter i wsp. 2007]. Podanie greliny powoduje zmniejszenie poziomu TNF α w surowicy [Konturek i wsp. 2006]. Podczas infekcji *Helicobacter pylori* stwierdzono natomiast obniżenie poziomu greliny [Isomoto i wsp. 2005, Zhang i wsp. 2005]. Prawdopodobnie wynika to z wywoływania przez infekcję stanu zapalnego. W stanie zapalnym stwierdzono bowiem obniżenie poziomu greliny [Otero i wsp. 2004, Koca i wsp. 2008], co może tłumaczyć utratę masy ciała. Podobnie długotrwały stan zapalny występujący w reumatoidalnym zapaleniu stawów, który wiąże się ze znaczną utratą masy ciała, może być skorelowany z poziomem greliny [Koca i wsp. 2008].

Grelina wykazuje również działanie kardioprotekcyjne - podana dożylnie powoduje spadek ciśnienia krwi poprzez zmniejszenie oporu obwodowego, jednocześnie nie wpływając na częstość skurczy serca [Nagaya i wsp. 2001], Skutkuje to wzrostem frakcji wyrzutowej, co zwiększa wydolność mięśnia sercowego [Nikolopoulos i wsp. 2010b]. Grelina powoduje również wzrost stężenia tlenku azotu (NO) w komórkach śródbłonna, regulując napięcie naczyń krwionośnych, hamując agregację płytek krwi i leukocytów w obwodowym układzie krwionośnym [Polińska i wsp. 2011].

Najważniejszą jednak funkcją greliny jest kontrola apetytu. Poziom greliny rośnie na skutek głodzenia - najwyższy jej poziom obserwuje się tuż przed posiłkiem i spada do minimum około godziny po posiłku [Cummings i wsp. 2001, Tschop i wsp. 2001a]. Grelina więc wyraźnie koreluje z posiłkami – jej poziom jest największy około 90 minut przed posiłkiem, natomiast po posiłku gwałtownie spada [Cummings i wsp. 2001, Suzuki i wsp. 2009, Toshinai i wsp. 2001] (Ryc. 5).

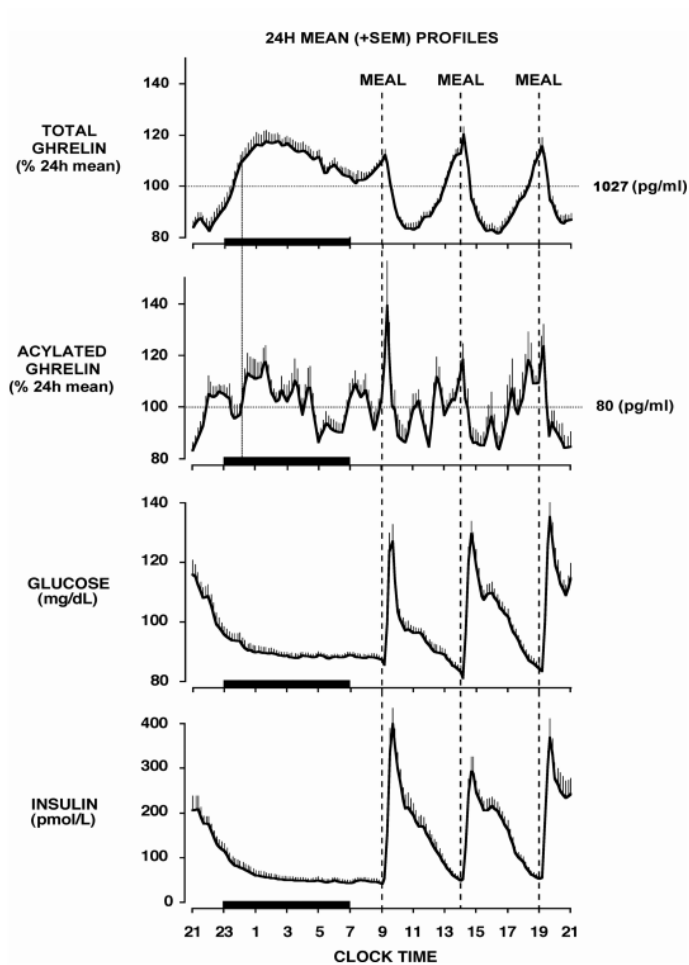
Przyjęcie pokarmu, ale również podanie egzogennej greliny powoduje spadek poziomu greliny we krwi [Korbonits i wsp. 2004]. Jej poziom równie gwałtownie spada po podaniu dożołądkowym tłuszczów, białek lub węglowodanów, natomiast podanie wody nie wpływa na poziom greliny [Gomez i wsp. 2004]. Stwierdzono też, że wydzielanie greliny nie ma związku z kalorycznością pożywienia [Nedvikova i wsp. 2003].



Ryc. 5. Dobowe poziomy greliny. Przerwywaną linią zostały zaznaczone posiłki. Czarne punkty to poziom greliny u osób szczupłych, białe punkty u osób otyłych. Na dole poziomy greliny u osób po bypassie żołądka. [wg Cummings i wsp. 2006].

Grelina w organizmie ulega wahaniom dobowym, skorelowanym z porami przyjmowania pokarmów i ze snem [Spiegel i wsp. 2011] (Ryc. 6). To potwierdza hipotezę, że grelina jest sygnałem inicjującym rozpoczęcie posiłku. Takie działanie greliny zostało zaobserwowane w badaniach u ludzi, którzy nie mieli wyznaczonych godzin posiłku i rozpoczynali jedzenie, kiedy odczuwali taką potrzebę [Cummings i wsp. 2004].

Poziom greliny wzrasta w nocy [Dzaja i wsp. 2004, Yildiz i wsp. 2004]. Jest on niższy u osób otyłych i wyższy u osób szczupłych [Tschop i wsp. 2001b, Bellone i wsp. 2002, Cummings i wsp. 2002b, Shiiya i wsp. 2002]. Poziom greliny jest również bardzo podniesiony u osób z anoreksją i bulimią [Otto i wsp. 2001] i ulega wyrównaniu po odzyskaniu właściwej masy ciała [Ariyasu i wsp. 2001, Otto i wsp. 2001, Cuntz i wsp. 2002, Tanaka i wsp. 2003a, 2003b]. Również kacheksja, która towarzyszy wielu wyniszczającym chorobom powoduje wzrost poziomu greliny [Nagaya i wsp. 2001, Yoshimoto 2002, Shimizu i wsp. 2003]. Jest to prawdopodobnie mechanizm kompensacyjny, w którym organizm zmierza do wyrównania niedoborów energetycznych.



Ryc. 6. 24-godzinny profil poziomu greliny całkowitej, greliny acylowanej (aktywnej), glukozy i insuliny u zdrowych mężczyzn. Na wykresie zaznaczony jest czas snu (czarna linia pozioma) oraz godziny posiłków (przerwana linia pionowa) [wg Spiegel i wsp. 2011].

U osób otyłych – zarówno u dzieci jak i u dorosłych, poziom greliny jest obniżony w stosunku do osób o prawidłowej masie ciała [Tschop i wsp. 2001, Reinehr i wsp. 2007, Vicennati i wsp. 2007]. Spostrzeżenie powyższe wskazuje na to, że grelina sama z siebie nie jest przyczyną otyłości i jej poziom obniża się w związku z mniejszym zapotrzebowaniem na energię u osób z nadwagą, co może wynikać z mechanizmu kompensacyjnego, tak jak to ma miejsce u osób z niedowagą. Potwierdzają tę teorię badania poziomu greliny u osób z syndromem Pradera-Willi’ego. W syndromie tym pacjenci charakteryzują się niskim wzrostem i opóźnieniem umysłowym z powodu deficytu GH, a także wzmożonym apetytem. Zaburzenie to może być spowodowane słabą aktywnością układu przywspółczulnego. Nadmierny apetyt prowadzi do rozwoju otyłości, co skutkuje zwiększoną śmiertelnością w wyniku cukrzycy i powikłań krążeniowych. Obserwuje się u tych pacjentów również 3-4 razy wyższy poziom obu form greliny niż u osób zdrowych [Cummings i wsp. 2002a, Del Parigi i

wsp. 2002]. Jest to prawdopodobnie spowodowane uszkodzeniem struktur podwzgórza u tych osób i jest to odwrotna korelacja niż u osób z niedowagą. Wcześniejsze badania dowodzą, że otyłość u ludzi cierpiących na ten syndrom nie wynika z wzmożonego apetytu, tylko z zaburzenia odczuwania sytości - a jak wiadomo sygnał sytości jest informacją, która gwałtownie obniża poziom greliny. Również niedobór GH może być powodem utrzymywania się wysokiego poziomu greliny [Del Parigi i wsp. 2002].

Stwierdzono również zmiany w poziomie greliny zależne od wieku – poziom greliny wzrasta w okresie od narodzin do osiągnięcia dorosłości i utrzymuje się na stałym poziomie [Cummings i wsp. 2001] natomiast spada w wieku podeszłym, gdzie obserwuje się również utratę masy ciała i zmniejszenie zapotrzebowania na pokarm [Rigamonti i wsp. 2002].

Grelina zwiększa też wydzielanie kwasu solnego w żołądku, uwalnianie gastryny, reguluje motorykę jelit poprzez nerw błędny i receptory w żołądku przyspieszając jego opróżnianie po posiłku [Dornonville de la Cour i wsp. 2004, Delzenne i wsp. 2010, Perboni i Inui 2010]. U pacjentów po gastrektomii obserwuje się utratę masy ciała i spadek poziomu greliny o ok. 10-50%, jednak po krótkim czasie ilość ta wzrasta do ok. 70%, prawdopodobnie przez mechanizmy kompensacyjne, czyli produkcję z jelit i trzustki [Cummings i wsp. 2002b, Geloneze i wsp. 2003, Leonetti i wsp. 2003].

U pacjentów po gastrektomii obserwuje się też osteopenię, czyli znaczący spadek gęstości mineralnej kości. Podawanie syntetycznej greliny hamuje ten proces. To może sugerować udział tego peptydu w mechanizmach kontrolujących formowanie się kości [Tovey i wsp. 1992, Svensson i wsp. 2001, Lehto-Axtelius i wsp. 2002]. Nikolopoulos i współpracownicy stwierdzili, że uczestnictwo greliny w procesach metabolicznych w obrębie kości jest związane z uwalnianiem GH, wpływem na oś podwzgórze-przysadka-nadnercza i działaniem korykotropowym oraz na wydzielanie cytokin [Nikolopoulos i wsp. 2010a].

W badaniach u ludzi wykazano, że wywołanie stresu zwiększało stężenie zarówno kortyzolu, jak i greliny [Rouach i wsp. 2007]. Jak stwierdzono, jej poziom wzrasta w okresie głodzenia, szczególnie postać acylowana, w związku z czym uznaje się, że głównie to ona odpowiada za odczuwanie apetytu, natomiast forma desacylowana wykazuje tutaj działanie antagonistyczne, [Yang i wsp. 2008a, Adams i wsp. 2011] być może funkcjonalnie, a nie receptorowo. W badaniach u myszy stwierdzono, że wywołanie stresu przez głodzenie lub przykre bodźce mechaniczne zwiększa tak samo mocno poziom greliny we krwi [Asakawa i wsp. 2001]. Wzrost poziomu greliny obserwujemy również w odpowiedzi na ostry i przewlekły stres zarówno u zwierząt [Kristensson i wsp. 2006, Lutter i wsp. 2008,

Ochi i wsp. 2008] jak i u ludzi [Rouach i wsp. 2007], stąd możliwe jest, że zmiany w poziomie greliny wpływają na nastrój, lęk i emocje.

Ekspresję receptora GHS-R1a wykazano również w komórkach pęcherzyka jajnikowego, ciała żółtego i w łożysku [Rak i wsp. 2009b, Castaneda i wsp. 2010, Nikolopoulos i wsp. 2010b]. U kobiet, stężenie mRNA dla greliny jest zależne od fazy cyklu i jest najwyższe w fazie lutealnej [Rak i Gregoraszczyk 2009a].

Jednak u myszy pozbawionych genu kodującego grelinę nie zaobserwowano znaczących zaburzeń. Myszy te miały prawidłową masę, wielkość, budowę ciała, behawior i zdolności reprodukcyjne. Zaobserwowano jedynie zmniejszenie ilości tkanki tłuszczowej. To wskazuje, że grelina nie jest kluczowym peptydem dla przeżycia i jego niedobór jest kompensowany innymi mechanizmami [Wortley i wsp. 2004a, 2004b].

1.4.5. Działanie ośrodkowe greliny

Grelina zasadniczo nie powinna przenikać przez barierę krew-mózg, pozostaje więc pytanie, w jaki sposób dociera ona do receptorów w mózgu, skoro jest wytwarzana w żołądku. Niektórzy badacze sądzą, że grelina może działać bezpośrednio na NARC oraz NAc, które są miejscem działania wielu hormonów - ze względu na nieszczelną w tym miejscu barierę krew-mózg, umożliwiającą przechodzenie przez nią peptydów, w tym również greliny [Norsted i wsp. 2008]. Znaleziono tam receptory dla większości hormonów związanych z równowagą energetyczną, łącznie z receptorem dla greliny, GHS-R1a [Abizaid i wsp. 2006a]. Inne teorie zakładają, że struktury w NARC mogą częściowo istnieć poza barierą krew-mózg i tam grelina może się przyłączać [Cone i wsp. 2001]. Uważa się jednak, że acylowana grelina może przekraczać barierę krew-mózg w obu kierunkach poprzez transport aktywny (*saturable transport system*), który może zachodzić tylko dla formy acylowanej [Horvath i wsp. 2001]. Natomiast forma desacylowana podlega tylko transportowi biernemu w jednym kierunku, do mózgu [Banks i wsp. 2002]. Transport greliny przez barierę krew-mózg jest nasilony przy dużym stężeniu triglicerydów, podczas głodzenia i w otyłości, co wyraźnie pokazuje zależność pomiędzy siłą jej działania i poziomem, a stanem energetycznym, a więc i przyjmowaniem pokarmów [Banks i wsp. 2002, 2008]. Forma desacylowana przenika łatwiej przez barierę krew-mózg, sądzono więc, że po przeniknięciu może ulegać ponownej „aktywacji” jednak jak do tej pory nie stwierdzono obecności GOAT w mózgu [Yang i wsp. 2008b].

Ponieważ GHRH jest wydzielany w podwzgórzu i działa na receptory w przysadce, zastanawiano się, czy również grelina może być tam wydzielana. Badania dowiodły, że stężenie greliny w mózgu jest bardzo małe [Kojima i wsp. 1999, Hosoda i wsp. 2000a]. Znalaziono ją głównie w NARC, ważnym regionie kontrolującym apetyt [Kojima i wsp. 1999, Lu i wsp. 2002]. Stwierdzono również obecność greliny w sąsiedztwie neuronów łączących podwzgórze z III komorą pomiędzy jądrem podwzgórza brzuszno-bocznym, PVN i NARC. W obszarach tych znajdują się neurony związane z wydzielaniem NPY i peptydem AgRP, mogące stymulować uwalnianie peptydów zaangażowanych w odczuwanie głodu.

Grelina działa na przysadkę mózgową bezpośrednio i pośrednio, synergistycznie z GHRH. Wpływa również na stymulację czynnika transkrypcyjnego Pit-1, który jest transkrybowany w przednim płacie przysadki mózgowej i prowadzi do ekspresji genu kodującego GH w komórkach somatotropowych [Nikolopoulos i wsp. 2010b]. Jest to więc jedyny obwodowy hormon stymulujący apetyt i pobieranie pokarmów oraz regulujący wydatek energetyczny poprzez wpływ na poziom GH, insuliny i glukozy oraz stymulację komórek wydzielających NPY [Willeesen i wsp. 1999], peptydem AgRP, POMC oraz transkryptami dla CART w NARC [Castaneda i wsp. 2010].

GH jest wielofunkcyjnym hormonem somatotropowym wydzielanym z przedniego płata przysadki. Reguluje wzrost komórek, metabolizm lipidów i równowagę wodno-elektrolitową [Argetsinger i wsp. 1996, Carter-Su i wsp. 1996]. Produkcja i uwalnianie hormonu wzrostu są ściśle kontrolowane, nadmierna produkcja GH prowadzi do akromegalii i gigantyzmu, natomiast jego niedobór u dzieci powoduje zaburzenia wzrostu. Uwalnianie GH zależy od wielu czynników, w szczególności od dwóch neuropeptydów podwzgórza - wydzielanie hormonu wzrostu jest stymulowane przez podwzgórzową somatoliberynę GH (GHRH) i hamowane przez somatostatynę [Muller i wsp. 1999, Anderson i wsp. 2004].

Receptory dla wydzielania GH (GHS-R), na które oddziałuje grelina są również zaangażowane w układ nagrody oraz odpowiedzialne za zachowania związane z aktywnością i poszukiwaniem nagrody [Guan i wsp. 1997, Mitchell i wsp. 2001, Zigman i wsp. 2006]. Grelina podana myszom w obszarze VTA powoduje wzrost stężenia DA w NAc i wzrost aktywności ruchowej [Abizaid i wsp. 2006b, Jerlhag i wsp. 2006, 2007]. Nieselektywny antagonist receptoru nikotynowego - mekamylamina, blokuje zarówno uwalnianie DA jak i działanie stymulujące greliny. Daje to podstawy do przypuszczeń, że również układ cholinergiczny jest zaangażowany w uwalnianie greliny [Jerlhag i wsp. 2006, Landgren i wsp. 2008]. Zaobserwowano bowiem wcześniej, że u szczurów preferujących picie dużych ilości

alkoholu, preferencja picia może być odwrócona przez blokery receptora nikotynowego [Ericson i wsp. 1998].

Obecność greliny i jej receptora w podwzgórzu [Bennett i wsp. 1997, Guan i wsp. 1997], regionie, który jest związany z nauką i pamięcią, sugeruje, że może ona brać udział w procesie uczenia się. Zdolność do szukania pokarmu i zdolności ponownego odnalezienia jego źródła jest kluczowa dla przeżycia. Zaangażowane w ten proces są mechanizmy związane z aktywnością i pamięcią oraz układ nagrody, który stymuluje do poszukiwań. W badaniach doświadczalnych z wykorzystaniem testu otwartego pola, testu krzyża, i testu biernego uniku po podaniu dokomorowym greliny obserwowano wzrost zastygania w teście otwartego pola, i spadek wejść i spędzanego czasu na polach jasnych w teście krzyża, co sugeruje, że grelina ma działanie anksjogenne [Carlini i wsp. 2002]. Co więcej, grelina zwiększała opóźnienie wejścia w teście biernym, co sugeruje, że może również mieć działanie poprawiające przypominanie [Carlini i wsp. 2002, 2010a]. Również w badaniach przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Farmakologii UM w Poznaniu zauważono po jednorazowym podaniu greliny aktywnej działanie poprawiające pamięć w teście biernego unikania, chociaż w tych badaniach grelina wykazywała raczej aktywność anksjolityczną [Szulc i wsp. 2007].

Zostały również przeprowadzone pierwsze badania nad działaniem syntetycznych, selektywnych agonistów dla receptora grelinowego, które wykazały m.in. poprawę pamięci w teście object recognition oraz poprawę zdolności do uczenia się, jednak związki te posiadają jednocześnie działanie anksjogenne [Atcha i wsp. 2009]. Uważa się, że dalsze poszukiwania agonoistów powinny zmierzać w kierunku uzyskania substancji o jednoznacznym wybiórczym działaniu na pamięć lub procesy związane z odczuwaniem lęku [Castaneda i wsp. 2010].

Inne badania pokazują, że grelina powoduje również zwiększenie gęstości synaps w hipokampie [Diano i wsp. 2006], co zdaje się potwierdzać hipotezę, że może być zaangażowana w różne mechanizmy przyjemnościowe oraz motywacyjne [Abizaid i wsp. 2006b, Zigman i wsp. 2006]. W badaniach z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego, u ludzi którym pokazywano obrazki związane z jedzeniem stwierdzono, że grelina powoduje silniejszą aktywność w obszarach mózgu odpowiedzialnych za odczuwanie przyjemności [Malik i wsp. 2008].

Greлина zwiększa również stężenie endogennych kanabinoidów w podwzgórzu, a one z kolei powodują wzrost jej stężenia. Kanabinoidy te działając przez receptory CB1 i CB2 umiejscowione w OUN oraz przewodzie pokarmowym i tkance tłuszczowej i powodują

wzrost łaknienia, działanie przeciwbólowe i poprawę samopoczucia. Zaobserwowano zwiększoną aktywność tego układu u osób otyłych [Engeli i wsp. 2005] oraz w okresie głodu, przy jednoczesnym wysokim stężeniu greliny [Kirkham i wsp. 2002].

Po podaniu centralnym, grelina poprawia funkcję przypominania [Carlini i wsp. 2002] niezależnie od wpływu na pobieranie pokarmu i lęk [Carlini i wsp. 2004]. W innych badaniach stwierdzono również, że po podaniu centralnym grelina poprawiała uczenie się i pamięć w sytuacjach, które były dla zwierząt nieprzyjemne (*aversive situations*) [Toth i wsp. 2009]. Mechanizm ten jest związany prawdopodobnie z 5-HT, ponieważ obwodowe podanie fluoksetyny, należącego do SSRI leku przeciwdepresyjnego, znosiło stymulujące efekty podanej do struktur mózgu greliny na pobór pożywienia i przypominanie [Brunetti i wsp. 2002, Carlini i wsp. 2007]. Również ogólnoustrojowe podanie fluoksetyny może powodować spadek masy ciała, prawdopodobnie przez ten sam mechanizm. Możliwe, że wszystkie działania greliny takie jak wpływ na pobieranie pokarmu, pamięć, lęk, depresję mogą zachodzić przy pewnym pośrednictwie 5-HT [Zigman i wsp. 2006, Harrold i wsp. 2008].

Poza mechanizmami związanymi z pamięcią, grelina jest również zaangażowana w odczuwanie lęku i powstawanie depresji [Asakawa i wsp. 2001, Carlini i wsp. 2002, 2004, 2008, Kineman i wsp. 2007]. Przypuszcza się, że mechanizm ten może być związany z działaniem poprzez CRH i hormon adrenokortykotropowy (ACTH) [Asakawa i wsp. 2001].

Dożylnie podanie greliny zwiększa poziom GH około 10 razy [Kojima i wsp. 1999]. Podobny efekt obserwujemy po podaniu dokomorowym. Jest to działanie bezpośrednie na przysadkę, jednak rola podwzgórza też jest ważna. U pacjentów z uszkodzonym podwzgórzem wzrost uwalniania GH jest tylko trzykrotnie większy.

Istotny udział w centralnym działaniu greliny odgrywa nerw błędny. Jest on zaangażowany zarówno w regulację poziomu greliny [Lee i wsp. 2002] jak i w jej działanie [Masuda i wsp. 2000]. Przecięcie nerwu błędnego podnosi znacząco poziom greliny oraz obserwuje się znaczący spadek uwalniania GH [Date i wsp. 2002, Lee i wsp. 2002, Williams i wsp. 2003], natomiast elektryczna stymulacja nerwu błędnego obniża poziom greliny u szczurów [Murakami i wsp. 2002]. Może to sugerować, że udział transmisji z nerwu błędnego jest konieczny do silnego uwalniania GH przez grelinę. Analiza immunohistochemiczna wykazała, że neurony zawierające grelinę znajdują się głównie w NARC, obszarze zaangażowanym w regulację apetytu [Kojima i wsp. 1999, Lu i wsp. 2002].

Podanie greliny bezpośrednio do komórek mózgu powoduje gwałtowny wzrost ilości spożywanego pokarmu [Tschop i wsp. 2000, Kamegai i wsp. 2001, Nicholls i wsp. 2001, Shintani i wsp. 2001, Wren i wsp. 2001b]. Ze wszystkich znanych peptydów grelina po

podaniu domózgowym wykazuje najsilniejsze działanie zwiększające apetyt, a długotrwałe podawanie greliny w ten sposób prowadzi do znacznej otyłości. Oprócz działania centralnego, udowodniono, że również podanie dożylnie i podskórne powoduje wzrost apetytu [Tschop i wsp. 2000, Nakazato i wsp. 2001, Wren i wsp. 2001a]. Ponieważ peptydy podane obwodowo z reguły nie przechodzą przez barierę krew-mózg jak już wyżej wspomniano, poszukiwano innego sposobu, w jaki obwodowa grelina oddziałuje na podwzgórze. Odkrycie receptorów dla greliny na neuronach wstępujących nerwu błędnego u szczura sugeruje, że sygnał greliny z żołądka jest transmitowany właśnie przez ten nerw [Date i wsp. 2002, Sakata i wsp. 2003, Zhang i wsp. 2004]. Co więcej, dokomorowe podanie greliny indukuje c-Fos w niektórych obszarach nerwu błędnego i stymuluje wydzielanie kwasu żołądkowego wskazując, że grelina aktywuje szlaki tego nerwu [Date i wsp. 2001]. Wykonanie wagoatomii blokuje możliwość stymulowania przez grelinę apetytu i wydzielania GH nie wpływając na jej poziom w surowicy [Andrews i wsp. 2002, Date i wsp. 2002]. Wzrost poziomu greliny poprzez głodzenie jest też całkowicie zniesiony przez podanie atropiny, co może mieć również związek z działaniem przez układ przywspółczulny [Williams i wsp. 2003].

Zarówno teoria o działaniu ośrodkowym związanym prawdopodobnie z nieszczelną barierą krew-mózg, jak i działanie przez nerw błędny, nie wykluczają się, lecz zrozumienie tych zależności wymaga dalszych badań.

1.4.6. Grelina w badaniach klinicznych

Niektórzy badacze uważają, że zastosowanie kliniczne greliny może dotyczyć diagnozowania i suplementacji niedoboru GH [Thorner et al 1997, Baldelli i wsp. 2001, Deghenghi i wsp. 2003] oraz leczenia zaburzeń żywienia takich jak anoreksja [Muccioli i wsp. 2002]. Ponieważ grelina znacząco poprawia kinetykę i zdolności wydzielnicze żołądka oraz przyspiesza jego opróżnianie - może być stosowana u pacjentów z pooperacyjną niedrożnością żołądka [Trudel i wsp. 2002].

Wykazano również, że intensywne ćwiczenia fizyczne obniżają poziom aktywnej greliny do 9 godzin po wysiłku [Marzullo i wsp. 2008], natomiast stosowanie samej diety podnosi ilość acylowanej greliny, co ma kompensować niedobór pokarmu, co może tłumaczyć fakt, że lepsze efekty w utracie masy ciała daje połączenie diety z uprawianiem sportu [Polińska i wsp. 2011].

1.4.7. Grelina a alkohol

1.4.7.1. Grelina a alkohol u zwierząt doświadczalnych

Etanol jest substancją silnie wywołującą owrzodzenia żołądka [Sibilia i wsp. 2003, Konturek i wsp. 2004]. Okazuje się, że etanol upośledza wydzielanie greliny w żołądku, prawdopodobnie poprzez mechanizm toksycznego działania na śluzówkę. Badania u szczurów dowodzą jednak, że grelina wykazuje w takiej sytuacji działanie gastroprotekcyjne [Konturek i wsp. 2004]. Podanie greliny zmniejsza wywołane etanolem owrzodzenia żołądka w sposób dawkozależny [Sibilia i wsp. 2003, Konturek i wsp. 2004]. Działanie ochronne jest obserwowane również po centralnym podaniu greliny i pośredniczą w nim szlaki dla NO. Zahamowanie syntezy NO przez L-NAME, całkowicie znosi działanie ochronne greliny na śluzówkę żołądka [Sibilia i wsp. 2003]. Działanie to jest utrzymane nawet po wagotomii, co może świadczyć, iż jest to inny mechanizm niż przy działaniu stymulującym greliny na sekrecję kwasu żołądkowego, które to działanie jest przerywane po przecięciu nerwu błędnego [Date i wsp. 2001].

W kolejnych badaniach stwierdzono, że grelina podana w okolice hipokampu zwiększa aktywność syntazy NO w tych okolicach, powodując zmianę poziomu NO, co może wiązać się z modyfikującym wpływem greliny na pamięć i konsolidację [Carlini i wsp. 2010b].

Uważa się, że grelina może oddziaływać na części mózgowia włączone w mechanizmy leżące u podstaw powstawania uzależnień [Olszewski i wsp. 2008]. Jest to prawdopodobne tym bardziej, że grelina może działać pobudzająco na aktywność zwierząt, co pozostaje w związku z jej wpływem na pobudzenie mezolimbicznego układu DA w NAc zarówno u szczurów jak i u myszy [Jerlhag i wsp. 2008a, 2008b].

Związek greliny z etanolem na podstawie dotychczasowych badań na zwierzętach nie jest jednoznaczny. Wiadomo, że u szczurów, którym podano do PVN i do podwzgórza grelinę zaobserwowano nasilenie pobierania pokarmów i wody (u szczurów NP i PR) natomiast nie zaobserwowano nasilenia picia alkoholu u PR [Eve i wsp. 2007]. Natomiast podanie domózgowe greliny (icv) wzmacnia konsumpcję alkoholu u myszy, co pozostaje również w silnej korelacji z działaniem pobudzającym alkoholu i greliny poprzez cholinergiczne receptory nikotynowe w VTA [Jerlhag i wsp. 2006]. Zaobserwowano również, że grelina nasila zachowania hiperaktywne po kokainie oraz jest konieczna do nagradzającego działania alkoholu [Wellman i wsp. 2005, Davis i wsp. 2007, Jerlhag i wsp. 2008b, 2009]. Z kolei u

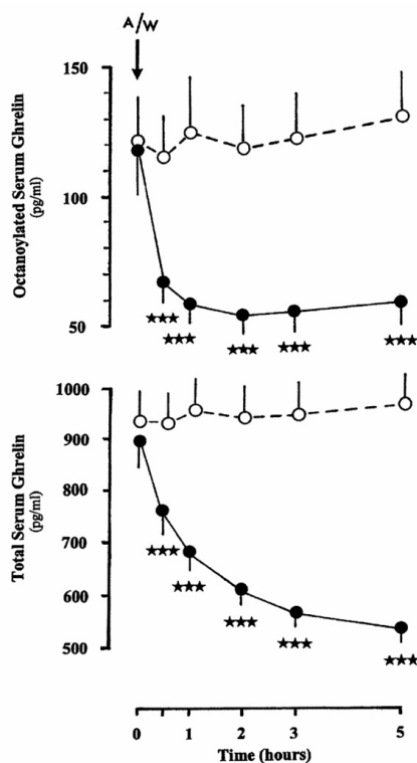
myszy, którym podano antagonistę GHS-R1a oraz tzw. knockouts nieposiadające tego receptora miały obniżoną preferencję dla pokarmów o działaniu nagradzającym zawierających cukry oraz dla alkoholu. Uwalnianie DA w NAc indukowane przez pokarmy nagradzające lub alkohol jest również obniżone u myszy typu knockout wobec genu kodującego GHS-R1a [Egecioglu i wsp. 2010].

1.4.7.2. Grelina a alkohol w badaniach klinicznych

Pierwsze doniesienia o możliwym związku hormonów regulujących apetyt i picie alkoholu pojawiły się w roku 2003 [Thiele i wsp. 2003, Kalra i Kalra 2004]. Poźniejsze badania wskazywały na możliwość ich udziału również w patofizjologii alkoholizmu [Kim i wsp. 2005] gdzie zaobserwowano wzrost poziomu greliny podczas abstynencji (powyżej 30 dni) u 47 mężczyzn w stosunku do kontroli (n=50). Również w innych badaniach u uzależnionych od alkoholu 21 kobiet i 97 mężczyzn stwierdzono wzrost poziomów greliny zarówno w okresie aktywnego picia, jak i w okresie detoksyfikacji w stosunku do kontroli (n=24) i nie stwierdzono związku greliny z przymusem picia [Kraus i wsp. 2005]. Natomiast w innych badaniach, jednorazowe podanie alkoholu zdrowym ochotnikom powodowało spadek poziomu greliny całkowitej (Ryc. 7) [Calissendorff i wsp. 2005, 2006, Addolorato i wsp. 2006, Zimmermann i wsp. 2007] i znaczącą, dodatnią korelację greliny z chęcią picia [Addolorato i wsp. 2006]. W kolejnych badaniach Wurst i wsp. zaobserwowali spadek greliny po okresie abstynencji [Wurst i wsp. 2007].

Wiadomo, że średnie ilości wypijanego alkoholu obniżają wydzielanie greliny [Calissendorff i wsp. 2005]. Efekt pojawia się po kilku minutach osiągając minimum po 75 minutach i trwa kilka godzin. Spadek poziomu greliny spowodowany alkoholem nie odpowiada jego wartości kalorycznej, więc nie może być tłumaczony tym faktem [Zimmermann i wsp. 2007].

W badaniach Badaoui i wsp. stwierdzono, że poziom aktywnej greliny u osób aktywnie pijących jest obniżony [Badaoui i wsp. 2008]. W innych badaniach stwierdzono jednak tendencję odwrotną, mianowicie, że poziom greliny we krwi wzrasta u osób aktywnie pijących dwukrotnie, a po odstawieniu trzykrotnie w stosunku do kontroli [Kraus i wsp. 2005]. W badaniach tych nie stwierdzono również wpływu greliny na przymus picia, natomiast późniejsze badania pokazują taką korelację [Badaoui i wsp. 2008].



Ryc. 7. Poziomy aktywnej (górze) i całkowitej (dół) greliny w czasie po podaniu alkoholu (czarne punkty) i wody (białe punkty) u 12 zdrowych osób. [wg Calissendorff i wsp. 2006].

W badaniach u ludzi, stwierdzono również pozytywną korelację między poziomem greliny w surowicy, a spożyciem alkoholu. Efekt ten jest najbardziej widoczny u kobiet szkodliwie pijących duże ilości alkoholu (*heavy-drinkers*) wskazując na nieliniową zależność pomiędzy ilością spożywanego alkoholu, a poziomem greliny [Makovey i wsp. 2007, Landgren i wsp. 2010].

W innych badaniach także stwierdzono podwyższony poziom greliny u pacjentów uzależnionych od alkoholu po dłuższym okresie abstynencji [Kim i wsp. 2005]. Zaobserwowano też, że poziom greliny po odstawieniu alkoholu u kobiet jest wyższy niż u mężczyzn [Wurst i wsp. 2007]. Ponieważ udowodniono także zmienność w poziomach greliny w związku z przyjmowaniem pokarmu, stresem, alkoholem, sposobem picia, płcią, wiekiem, BMI, czy porą dnia, być może różnice te wynikają z rozbieżności w stosowanych schematach doświadczeń. Ponadto w niektórych cytowanych pracach pacjenci utrzymywali abstynencję całkowicie, a w niektórych nie można było wykluczyć picia przez nich alkoholu [Calissendorff i wsp. 2005, Kim i wsp. 2005, Wurst i wsp. 2007, Badaoui i wsp. 2008].

Picie alkoholu zwiększa spożycie pokarmów, zarówno u osób z otyłością jak i u osób z normalną masą [Poppit i wsp. 1999, Westerterp-Plantenga i Verwgen 2009]. Mechanizm

tego działania jest nieznany, ale obserwuje się hamowanie oksydacji kwasów tłuszczowych i zmiany poziomów niektórych hormonów oraz wpływ na niektóre układy neuroprzekaznikowe [Wilding 2002, Druce i Bloom 2003, Yeomans i wsp. 2003].

Zarówno uzależnienie od alkoholu jak i odstawienie są sytuacjami stresującymi, które mogą działać anksjogenicznie. Stres jest ważnym czynnikiem przyczyniającym się do rozwoju alkoholizmu i powrotu do nałogu po przerwaniu picia. Na skutek stresu dochodzi do obniżenia apetytu, wpływ greliny na ten efekt nie jest znany [Zimmermann i wsp. 2007].

Na podstawie analizy dotychczasowych badań przeprowadzonych w modelach doświadczalnych jak i w badaniach klinicznych, można stwierdzić, że istnieje związek między greliną, w tym również jej stężeniem we krwi, a działaniem alkoholu. Badania te nie dały jednak jednoznacznej odpowiedzi, jaki jest kierunek tych zmian, innymi słowy czy alkohol wpływa na podniesienie czy obniżenie poziomu greliny we krwi. Niewątpliwie na taki obraz otrzymanych wyników miały wpływ różne układy doświadczeń, różne modele czy narzędzia badawcze oraz nie zawsze jednoznaczne kontrolowanie zespołu odstawienia.

2. CEL BADAŃ

Znane są dane skłaniające do hipotezy, że grelina mogłaby uczestniczyć w ośrodkowym działaniu alkoholu, jak i ewentualnie stanowić obwodowy wskaźnik zmian towarzyszących długotrwałemu picciu alkoholu [Calissendorff i wsp. 2005]. Wiadomo, że istnieje związek między działaniem niektórych leków antypsychotycznych czy środków o działaniu stymulującym, a stężeniami greliny we krwi obwodowej [Palik i wsp. 2005, Murashita i wsp. 2007].

Stąd, postanowiono określić udział greliny w aktywności leków przeciwalkoholowych w modelu doświadczalnym uzależnienia alkoholowego. W tym celu zaplanowano wykonanie następujących badań:

1. Określenie związku pomiędzy stężeniem alkoholu, a stężeniem greliny po podaniu jednorazowym alkoholu jak i podczas długotrwałego picia alkoholu przez zwierzęta doświadczalne.
2. Poszukiwanie odpowiedzi na pytanie, czy grelina może być wskaźnikiem różnicującym preferencję do picia alkoholu pomiędzy heterozygotycznymi szczurami (tzw. środowiskowy model indukcyjny), a szczurami pochodzącymi z linii (model genetyczny).
3. Poszukiwanie związku pomiędzy działaniem przeciwalkoholowym wybranych środków, a stężeniem greliny w surowicy u szczurów poddanych długotrwałemu działaniu alkoholu z zastosowaniem:
 - a. leków o działaniu przeciwalkoholowym (akamprozat, naltrekson),
 - b. środków o spodziewanym działaniu przeciwalkoholowym pochodzenia roślinnego - wyciągu z korzenia ołownika łąkowego - kudzu (*Pueraria lobata*, Willd Ohwi) i jego głównych izoflawonoidów - pueraryny i daidzyny.

3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

3.1. Materiały i metody

3.1.1. Odczynniki i leki

- alkohol etylowy – spirytus rektyfikowany 95% „Polmos”; roztwór 10% [g/g]
- metyloceluloza (MC) – Methyl cellulose, roztwór 0,5%; Sigma-chemical CO., Japonia
- akamprozat (AC) (Campral) – Merck Sante, 333 mg tabletki powlekane
- naltrekson (NAL) – substancja (98%) Sigma-Aldrich
- *Pueraria lobata* - wyciąg etanolowy z korzenia ołownika łąkowego (KU) - extractum siccum (zawartość ogólna izoflawonoidów - 41,1%, w tym: 32,5% PUE, 6,9% DAI, 1,6% daidzeiny oraz 0,02% genisteiny). P.L. Thomas and Co., Inc., USA. z którego przyrządzano zawiesinę wodną w 0,5% MC, (1 g/10 ml)
- daidzyna (DAI) (98%) – Glycine mas. (L.) Merr. „Shanxisciphar Biotechnology CO.”, Chiny, proszek z którego przyrządzano zawiesinę w 0,5% MC (10 mg/1 ml)
- pueraryna (PUE) (98%) – Glycine mas. (L.) Merr. „Shanxisciphar Biotechnology CO.”, Chiny, proszek z którego przyrządzano zawiesinę w 0,5% MC (10 mg/1 ml)
- EDTA – roztwór 0,5%
- PHMB – benzoesan p-hydroksyrtęciowy (98%) Sigma-Aldrich, proszek do sporządzenia roztworu 1%
- HCl – roztwór 1N

3.1.2. Zwierzęta

Uzyskano zgodę na wykonanie przeprowadzonych doświadczeń na zwierzętach w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (Numer zgody Lokalnej Komisji Etycznej Do Spraw Doświadczeń Na Zwierzętach: 03/2008).

3.1.2.1. Szczury Wistar

Część badań przeprowadzono na szczurach, samcach szczepu Wistar. Zwierzęta przebywały w osobnych klatkach, z tworzywa sztucznego, w pomieszczeniu, w którym temperatura wynosiła $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, wilgotność 65-75%.

Przez cały okres doświadczenia szczury miały swobodny dostęp do wody (za wyjątkiem okresów indukcji) i standardowej paszy laboratoryjnej (peletki, Labofeed BLSM) (za wyjątkiem 12 godzin przed dekapitacją) oraz w odpowiednich okresach badań do 10% alkoholu etylowego.

Przed rozpoczęciem doświadczeń szczurom odwrócono cykl dobowy (światło od godziny 19⁰⁰ do godziny 7⁰⁰).

3.1.2.2. Szczury WHP i WLP

Pozostała część badań została przeprowadzona na szczurach, samcach szczepu Wistar, wyprowadzonych z linii o wysokiej preferencji picia tzw. WHP (Warsaw High Preferring, pokolenie 42-48) i o niskiej preferencji picia, tzw. WLP (Warsaw Low Preferring, pokolenie 45-51), otrzymanych z Zakładu Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego, Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie, dzięki uprzejmości Pani doc. dr hab. Wandy Dyr.

Warunki utrzymania hodowli oraz żywienia i picia były identyczne jak w przypadku szczurów Wistar.

3.1.3. Pomiar masy ciała zwierząt

Dla doświadczeń z podaniem danej substancji jednorazowo, zwierzęta były ważone w dniu podania substancji w celu doboru właściwej dawki. Dla doświadczeń z długotrwałym piciem alkoholu przez szczury i podawaniem substancji lub leków, pomiaru dokonywano na początku każdego kolejnego cyklu. Przeprowadzone pomiary masy ciała zwierząt umożliwiły prawidłowe wyliczenie ilości wypijanego etanolu i wody/kg m.c. oraz korektę dawki podawanych związków.

3.1.4. Proces wyodrębniania zwierząt PR i NP

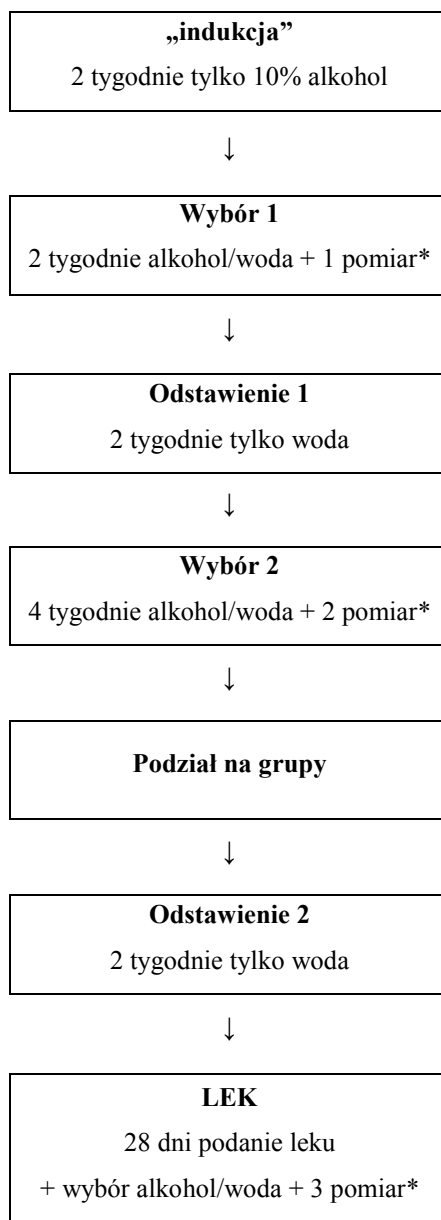
W przypadku zwierząt szczepu Wistar dla przeprowadzenia zaplanowanych badań konieczne było uzyskanie zwierząt preferujących picie alkoholu z wolnego wyboru (PR) jak i zwierząt pozbawionych takiej preferencji (NP). Doświadczenia rozpoczynano na grupie liczącej 100 osobników. W trakcie trwania doświadczenia zwierzęta miały zapewniony stały dostęp do pokarmu.

W celu wyłonienia z grupy zwierząt NP i PR zastosowano model stosowany uprzednio w Katedrze [Daoust i wsp. 1987, Mikołajczak i wsp. 1999] z pewnymi modyfikacjami (Ryc. 8.).

W pierwszym etapie doświadczeń stosowano indukcję, czyli dwutygodniowe podawanie szczurom 10% alkoholu, jako jedyne go płynu do picia. Po tym okresie przez 2 tygodnie umożliwiano zwierzętom swobodny dostęp do wody i alkoholu (okres wyboru). W drugim tygodniu wyboru dokonywano pierwszego pomiaru ilości wypijanych płynów. Przez 7 dni, codziennie, notowano ilość wypijanej wody i alkoholu przez poszczególne szczury. W kolejnym etapie wprowadzono 2 tygodniowe odstawienie alkoholu – w tym okresie szczury miały zapewniony dostęp jedynie do wody.

Następnie przez okres 4 tygodni zwierzęta miały swobodny dostęp do roztworu etanolu oraz wody. W ostatnim tygodniu tego okresu ponownie, codziennie mierzono ilość wypijanej wody i alkoholu przez szczury. Na podstawie otrzymanych danych wyodrębniano grupy szczurów NP (pijące <1 g/kg m.c. etanolu na dobę) i PR (>3 g/kg m.c. etanolu na dobę). Ponownie zastosowano dwutygodniowy okres odstawienia. Następnie w zależności od doświadczenia dzielono zwierzęta na odpowiednie grupy otrzymujące daną substancję/lek i odpowiednie vehiculum (MC lub H₂O).

W przypadku zwierząt pochodzących z linii w schemacie uzależniania pomijano etap indukcji. W kolejnych cyklach mierzono kontrolnie ilość wypijanego alkoholu, wody oraz masę ciała zwierząt i weryfikowano odruch picia u zwierząt WHP i WLP według tych samych kryteriów jak dla zwierząt NP i PR.



Ryc. 8. Schemat uzależniania zwierząt.

* 1,2,3 pomiar – mierzenie objętości wypijanych płynów oraz masy ciała zwierząt przez ostatni tydzień.

3.1.5. Jednorazowe dootrzewnowe podanie etanolu

W badaniach nad wpływem jednorazowego podania etanolu na poziomy greliny, zwierzętom podawano jednorazowo dootrzewnowo etanol w roztworze 30%, w dawkach 1,0; 2,0 i 4,0 g/kg m.c. oraz odpowiednią objętość H₂O grupie kontrolnej. Po 120 min. od

podania zwierzęta dekapitowano i krew do dalszych oznaczeń pobierano według schematu z rozdziału 3.1.7.

3.1.6. Badanie rozwoju tolerancji

W doświadczeniu dotyczącym rozwoju tolerancji na działanie etanolu zwierzęta WHP otrzymywały dootrzewnowo 20% etanol, w dawce 3 g/kg m.c., według modelu stosowanego uprzednio w Katedrze Farmakologii [Crabbe i wsp. 1982, Okulicz-Kozaryn i wsp. 1992] oraz dożoładkowo KU w dawce 500 mg/kg m.c. Zwierzęta podzielono na 4 grupy: woda+MC (H₂O+MC), woda+KU (H₂O+KU), etanol+MC (Et+MC), etanol+KU (Et+KU).

Przez 8 dni trwania doświadczenia zwierzęta raz dziennie otrzymywały dożoładkowo KU lub MC. Po godzinie od podania KU lub MC szczury otrzymywały dootrzewnowo etanol lub odpowiednio wodę do wstrzyknięć w tej samej objętości. Następnie w 1,3,5 i 8 dobie (po 30, 60 i 90 minutach od podania etanolu) mierzono temperaturę ciała zwierząt w odbycie termometrem cyfrowym (TTK-3011, Temed Zabrze).

W ostatnim, 8 dniu doświadczenia po pomiarze temperatury zwierzęta dekapitowano i pobierano krew do dalszych oznaczeń według procedury opisanej w rozdziale 3.1.7.

3.1.7. Pobieranie i zabezpieczanie surowicy do oznaczeń poziomów greliny

Zwierzęta, u których mierzono poziom fizjologicznej greliny, greliny po badaniach tolerancji etanolowej oraz greliny po okresie preferencji głodzono 12 godzin przed dekapitacją w celu uniknięcia wpływu pokarmu na poziomy greliny we krwi. U zwierząt otrzymujących substancje (lub leki), podawano je 1 godzinę przed badaniem (w przypadku podania dootrzewnowo) lub 2 godziny przed badaniem (w przypadku podania dożoładkowo). Zwierzęta dekapitowano i próbki krwi (5 ml) pobierano na 0,5% EDTA (0,5 ml) w celu zapobiegania powstawania skrzepów oraz dodawano 100 µl 1% PHMB (benzoesan p-hydroksyrteciowy) w celu przeciwdziałaniu degradacji białek. Następnie krew odwirowywano przez 15 min (4500 obr/min) w temp. 4°C. Otrzymaną surowicę w ilości 1,0 ml zabezpieczano dodając 100 µl 1N HCl w celu stabilizacji próbki i zamrażano w temperaturze -80°C do późniejszych oznaczeń.

W badaniu poziomów NAL, krew pobierano wielokrotnie przyżyciowo z ogona i postępowano z nią dalej według schematu opisanego powyżej.

3.1.8. Oznaczanie poziomu etanolu we krwi obwodowej

Do oznaczeń stężenia etanolu we krwi obwodowej szczurów pobierano krew natychmiast po dekapitacji i postępowano według procedur z rozdziału 3.1.7. Do oznaczeń pobierano 0,1 ml krwi pełnej dodając 0,5 ml propionitrylu jako wzorca wewnętrznego i zabezpieczano całość w szczelnej fiolce.

Badanie wykonano przy pomocy metody chromatografii gazowej (GLC) z wykorzystaniem techniki head-space na urządzeniu AutoSytem XL z przystawką Headspace Autosampler Tubomatrix 40 (Perkin Elmer) z oprogramowaniem Totalchrom Workstation ver. 6.2.0. stosując kolumnę kapilarną Elite BAC-2 (dł. 30 m, średnica 0,532, grubość filmu 2 μm) [Wachowiak i wsp. 1990, Wójciak i wsp. 1990, Mikołajczak i wsp. 1994].

Oznaczenia wykonano w Pracowni Analiz Chemicznych i Związków Toksycznych i Dopingowych, Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej UM w Poznaniu.

3.1.9. Oznaczanie poziomu greliny aktywnej i całkowitej

Oznaczeń stężeń całkowitej greliny (total) w surowicy dokonano metodą ELISA z zastosowaniem zestawu (kitu) firmy Phoenix Pharmaceuticals, Inc. USA o granicy oznaczalności 10 pg/ml.

Oznaczeń stężeń greliny aktywnej (acylowanej) w surowicy dokonano stosując metodę ELISA z zastosowaniem zestawu (kitu) firmy SPI-Bio o granicy oznaczalności 1 pg/ml.

Oznaczeń dokonywano przy pomocy urządzenia SUNRISE-BASIC firmy Tecan z oprogramowaniem Magellan ver. 1.1 do odczytu absorbancji, dopasowaniem krzywej stężeń wg wartości wzorcowych oraz wyliczenia bezwzględnych poziomów greliny w próbce. Pomiaru dokonywano przy długości fali 450 nm.

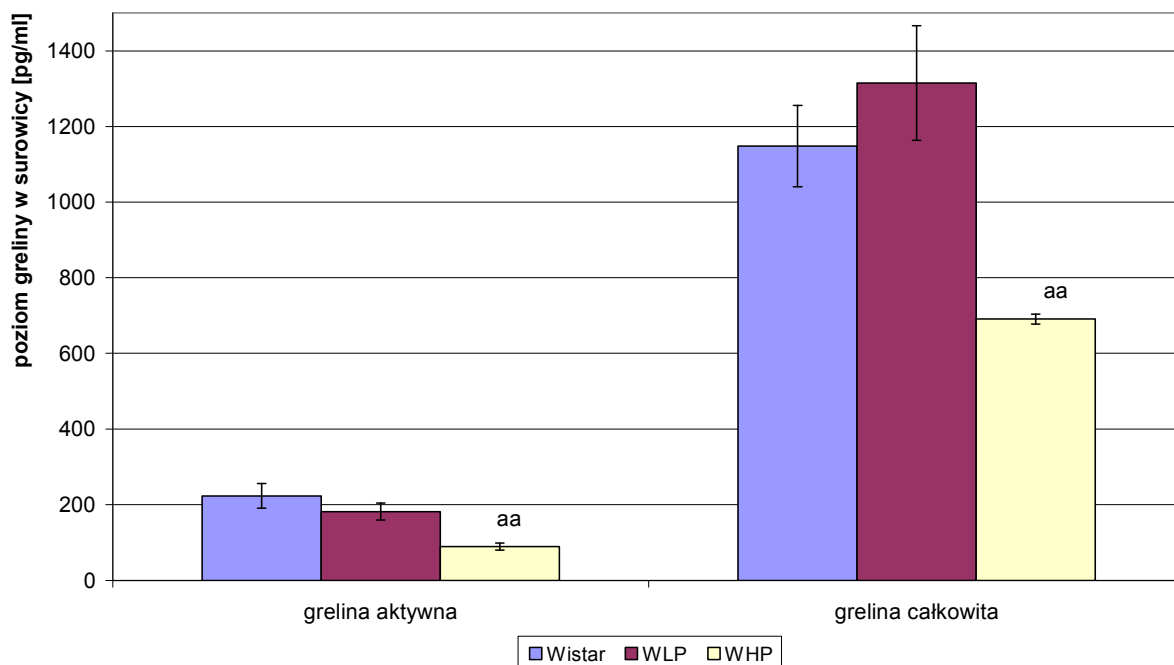
3.2. Analiza statystyczna

Wartości uzyskane przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm SEM. Obliczenia statystyczne wykonano stosując analizę wariancji ANOVA jednoczynnikową, lub odpowiednio analizę ANOVA dla układów z powtarzanymi pomiarami. Dalszą analizę statystyczną przeprowadzono z zastosowaniem tzw. testu post-hoc LSD (test najmniejszej różnicy Fishera) w celu zanalizowania efektów w poszczególnych grupach. Ocenie statystycznej poddano wszystkie wyniki przy minimalnym założeniu istotności statystycznej na poziomie $\alpha=0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Fizjologiczne poziomy greliny u szczurów Wistar, WLP i WHP

Część doświadczeń przeprowadzono na szczurach wywodzących się z linii o utrwalonym odruchu picia alkoholu z wolnego wyboru, stąd postanowiono określić, jakie wartości fizjologiczne stężenia greliny występują u tych zwierząt (nie poddanych działaniu alkoholu) w porównaniu ze szczurami szczepu Wistar. Stwierdzono występowanie istotnej zmienności między badanymi grupami, tak dla greliny aktywnej (ANOVA: $F(2, 43)=5,79$; $p=0,005$) jak i całkowitej (ANOVA: $F(2, 52)=4,36$; $p=0,018$). Zwierzęta niepreferujące picia alkoholu (WLP) wykazywały poziomy obu form greliny zbliżone do wartości obserwowanych u szczurów Wistar (Ryc. 9). Niewielkie różnice nie były istotne statystycznie. Natomiast u zwierząt WHP poziom greliny zarówno aktywnej jak i całkowitej był obniżony w sposób istotny w stosunku do odpowiedniej grupy Wistar i WLP ($p < 0,001$) (Ryc. 9.). Jednocześnie stwierdzono brak zmienności masy ciała użytych zwierząt (ANOVA: $F(2, 49)=0,539$; $p=0,586$) jak i ilości wypijanych przez nie wody (ANOVA: $F(2, 40)=0,113$; $p=0,893$) (Tab. 1.).



Ryc. 9. Fizjologiczne poziomy greliny aktywnej i całkowitej u szczurów Wistar, WLP i WHP.

n= 13-19; średnia±SEM; aa - względem grupy Wistar i WLP, $p < 0,001$

Tab. 1. Zmiany masy oraz ilości wypijanej wody u szczurów Wistar, (pozbawionych dostępu do alkoholu) oraz szczurów WLP i WHP (również pozbawionych dostępu do alkoholu).

Grupa	n	Masa [g]	Ilość wypijanej wody [ml/kg m.c./d]
Wistar	25	422,4±11,2	54,0±1,6
WLP	19	442,1±24,9	55,0±3,7
WHP	8	448,7±5,1	55,8±4,4

średnia±SEM

4.2. Wpływ jednorazowego podania etanolu na poziomy greliny w surowicy szczurów Wistar

W doświadczeniu określono wpływ jednorazowego dootrzewnowego podania etanolu w 3 dawkach (1,0; 2,0 i 4,0 g/kg m.c., i.p.) szczurom Wistar na poziomy greliny aktywnej (Ryc. 10.) oraz całkowitej (Ryc. 11.). Zwierzęta kontrolne otrzymały odpowiednią objętość wody do wstrzyknięć.

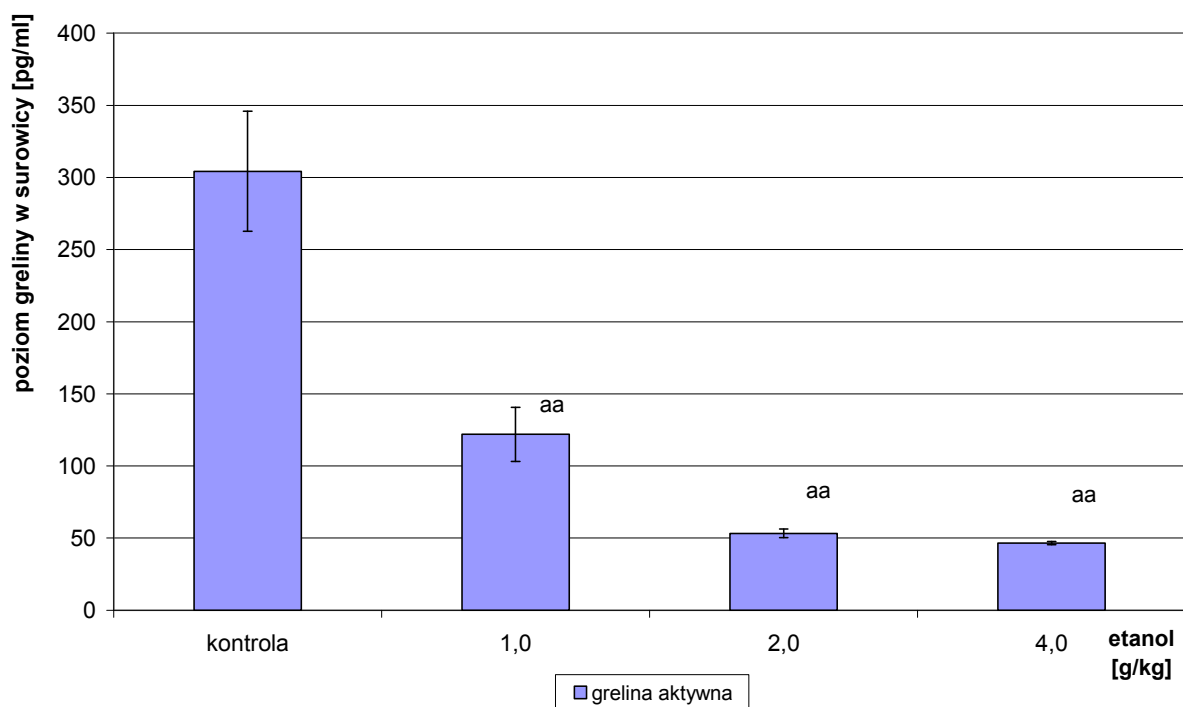
Stwierdzono dawkozależną zmienność, odwrotnie proporcjonalną pomiędzy dawką etanolu, a poziomem greliny aktywnej (ANOVA: $F(3, 28)=27,4$; $p=0,0000$) jak i całkowitej (ANOVA: $F(3, 28)=22,5$; $p=0,0000$). Nie zauważono istotnych różnic w masach zwierząt użytych w tym doświadczeniu (ANOVA: $F(3, 28)=1,75$; $p=0,178$) (Tab. 2.).

Jednocześnie zmierzono poziom etanolu we krwi u tych samych zwierząt (Ryc. 12.). Zaobserwowano dawkozależną, wprost proporcjonalną, statystycznie istotną zależność między poziomem alkoholu we krwi, a podaną dawką etanolu (ANOVA: $F(3, 25)=96,90$; $p=0,0000$).

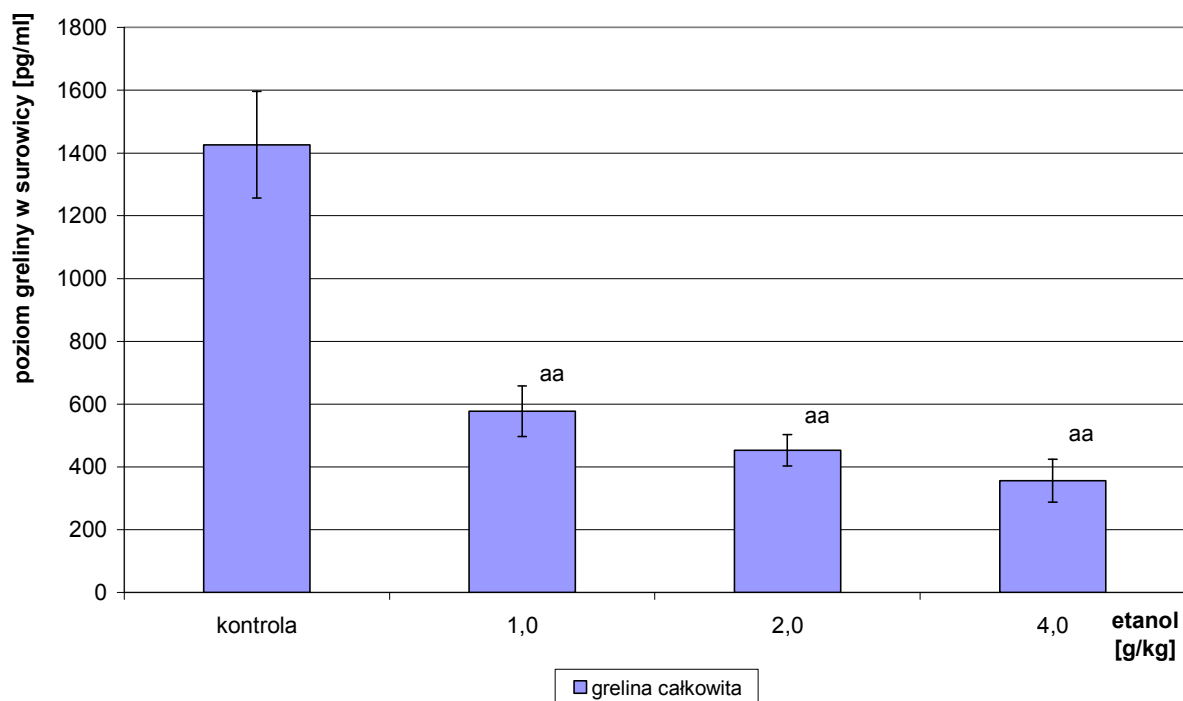
Tab. 2. Analiza masy szczurów Wistar po jednorazowym podaniu etanolu.

Grupa	n	Masa [g]
kontrola	8	341,2±4,4
1,0	8	323,7±8,0
2,0	8	340,0±3,8
4,0	8	331,2±7,4

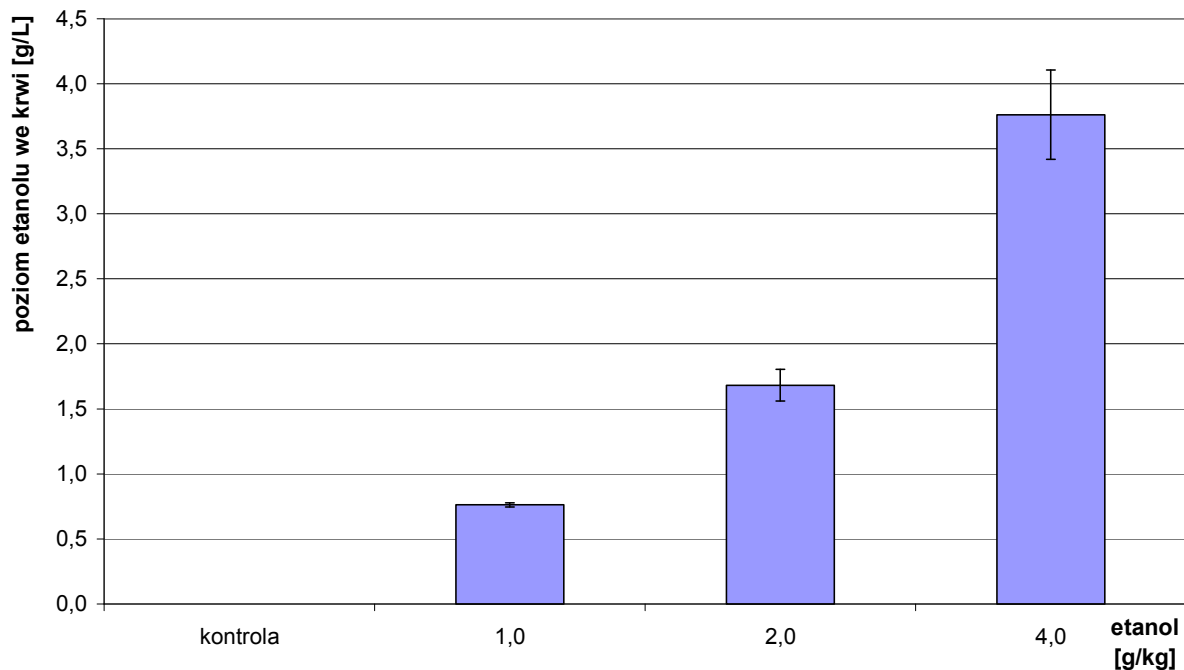
średnia±SEM



Ryc. 10. Poziomy greliny aktywnej u szczurów Wistar po jednorazowym dootrzewnym podaniu etanolu.
n= 8; średnia±SEM; aa - względem grupy kontrolnej, $p<0,001$



Ryc. 11. Poziomy greliny całkowitej u szczurów Wistar po jednorazowym dootrzewnym podaniu etanolu.
n= 8; średnia±SEM; aa - względem grupy kontrolnej, $p<0,001$



Ryc. 12. Poziomy etanolu we krwi u szczurów Wistar po jego jednorazowym dootrzewnowym podaniu.

n= 8; średnia±SEM

4.3. Wpływ jednorazowego podania etanolu na poziomy greliny w surowicy szczurów WLP i WHP

Określono również wpływ jednorazowego dootrzewnowego podania szczurom WHP i WLP etanolu w 3 dawkach (1,0; 2,0 i 4,0 g/kg m.c., i.p.) na poziomy greliny aktywnej (Ryc. 13.) oraz całkowitej (Ryc. 14.). Zwierzęta kontrolne otrzymały odpowiednią objętość wody do wstrzyknięć.

U szczurów WLP analogicznie jak w poprzednim doświadczeniu na szczurach Wistar (rozdział 4.3) stwierdzono dawkozależną zmienność, odwrotnie proporcjonalną pomiędzy dawką etanolu, a poziomem greliny aktywnej (ANOVA: $F(3, 17)=23,2$; $p=0,0000$) jak i całkowitej (ANOVA: $F(3, 17)=20,8$; $p=0,0000$) (Ryc. 13., Ryc. 14.). Natomiast u szczurów WHP zaobserwowano odwrotnie niż dla zwierząt WHP, wprost proporcjonalną zależność pomiędzy dawką etanolu, a poziomem greliny aktywnej (ANOVA: $F(3, 19)=17,9$; $p=0,0000$) jak i całkowitej (ANOVA: $F(3, 17)=17,2$; $p=0,0000$).

Zmierzono również poziom etanolu we krwi zwierząt po jego podaniu w wymienionych dawkach (Ryc. 15.). Zaobserwowano dawkozależny, wprost proporcjonalny i statystycznie istotny związek pomiędzy poziomem alkoholu we krwi, a podaną dawką etanolu

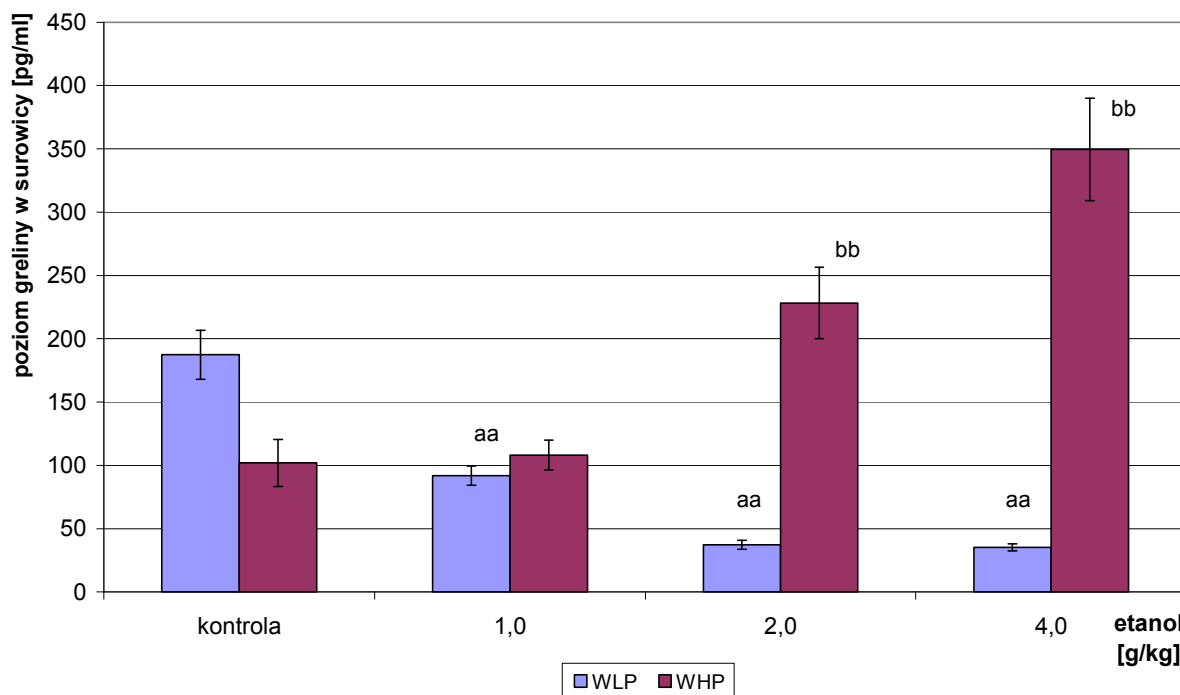
tak u zwierząt WLP (ANOVA: $F(3, 17)=255,5$; $p=0,0000$) jak i u WHP (ANOVA: $F(3, 19)=56,8$; $p=0,0000$).

Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w masach zwierząt tak WLP (ANOVA: $F(3, 19)=2,86$; $p=0,038$) jak i WHP (ANOVA: $F(3, 19)=11,8$; $p=0,014$) (Tab. 3).

Tab. 3. Analiza masy szczurów WLP i WHP po jednorazowym podaniu etanolu.

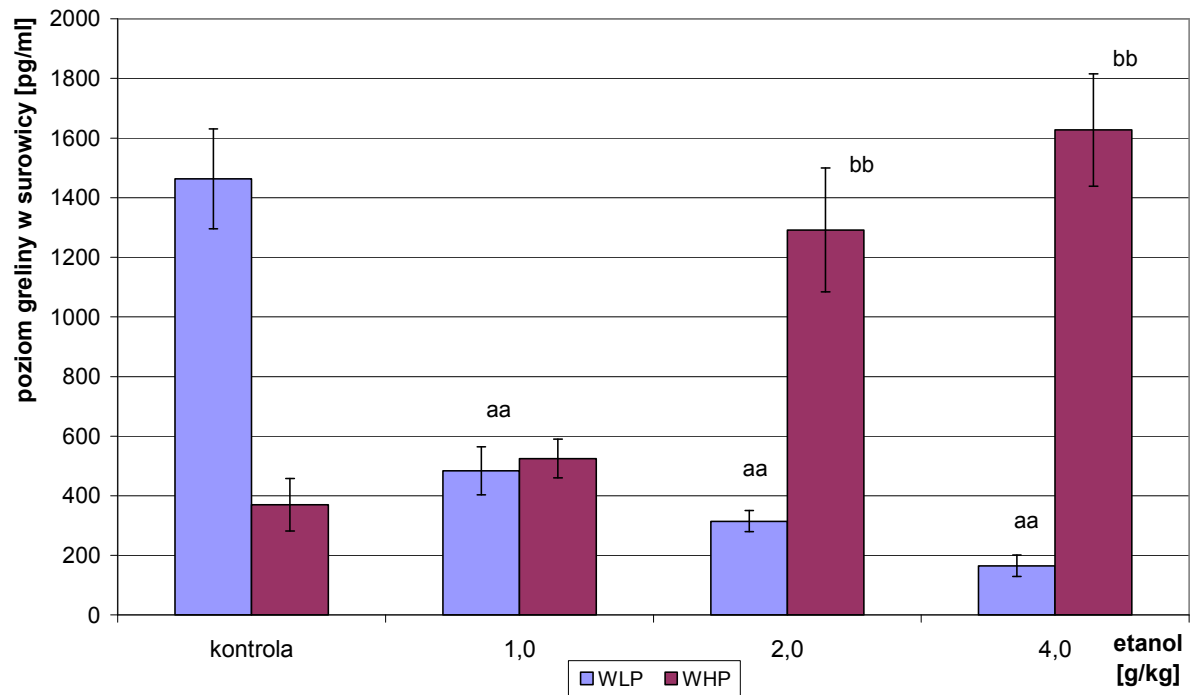
Grupa	n	Dawka etanolu [g/kg m.c.; i.p.]	Masa [g]
WLP	8	kontrola	362,5±6,7
	5	1,0	358,0±9,2
	5	2,0	368,0±28,3
	5	4,0	364,0±10,2
WHP	5	kontrola	356,0±11,7
	6	1,0	351,0±18,6
	6	2,0	353,3±8,3
	6	4,0	353,0±25,8

średnia±SEM



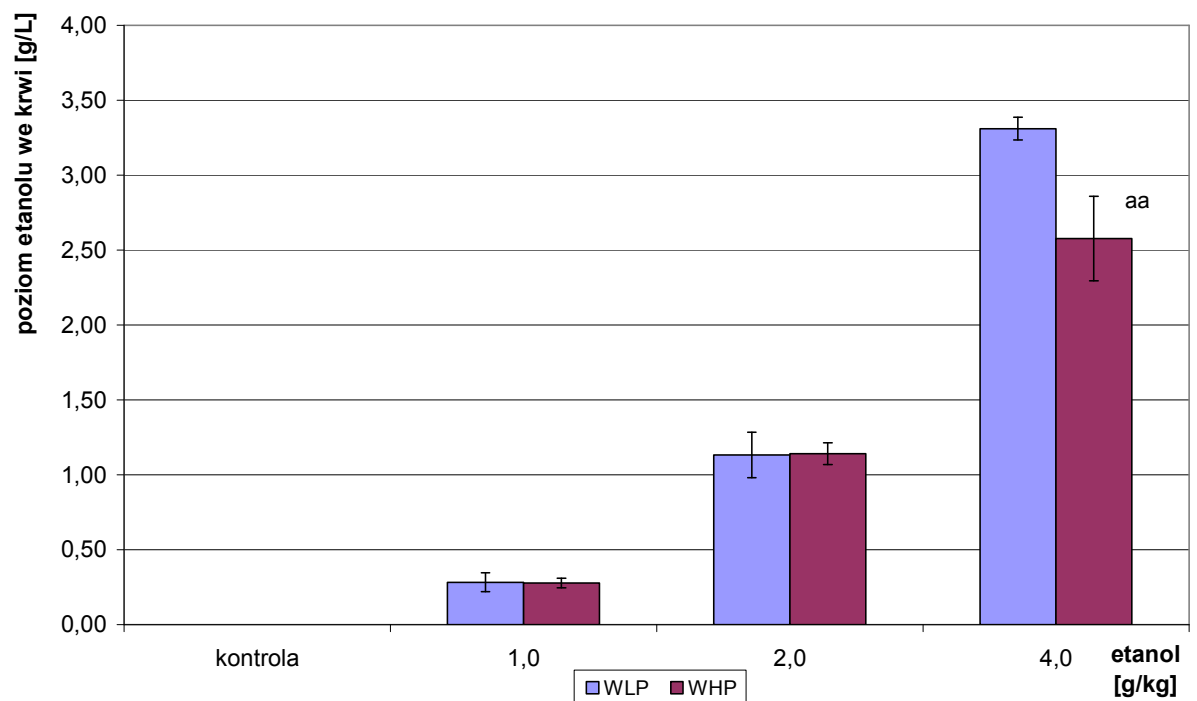
Ryc. 13. Poziomy greliny aktywnej w surowicy u szczurów WLP i WHP po jednorazowym dootrzewnowym podaniu etanolu.

$n=6-8$; średnia±SEM; aa – wzgl. grupy kontrolnej WLP, $p<0,001$; bb – wzgl. grupy kontrolnej WHP, $p<0,001$



Ryc. 14. Poziomy greliny całkowitej w surowicy u szczurów WLP i WHP po jednorazowym dootrzewnowym podaniu etanolu.

n=6-8; średnia±SEM; aa – wzgl. grupy kontrolnej WLP, $p<0,001$; bb – wzgl. grupy kontrolnej WHP, $p<0,001$



Ryc. 15. Poziomy etanolu we krwi u szczurów WLP i WHP po jednorazowym dootrzewnowym podaniu etanolu.

n=6-8; średnia±SEM; aa - względem grupy WLP dla dawki 4,0 g/kg m.c., $p<0,001$

4.4. Wpływ etanolu na rozwój tolerancji u szczurów WHP

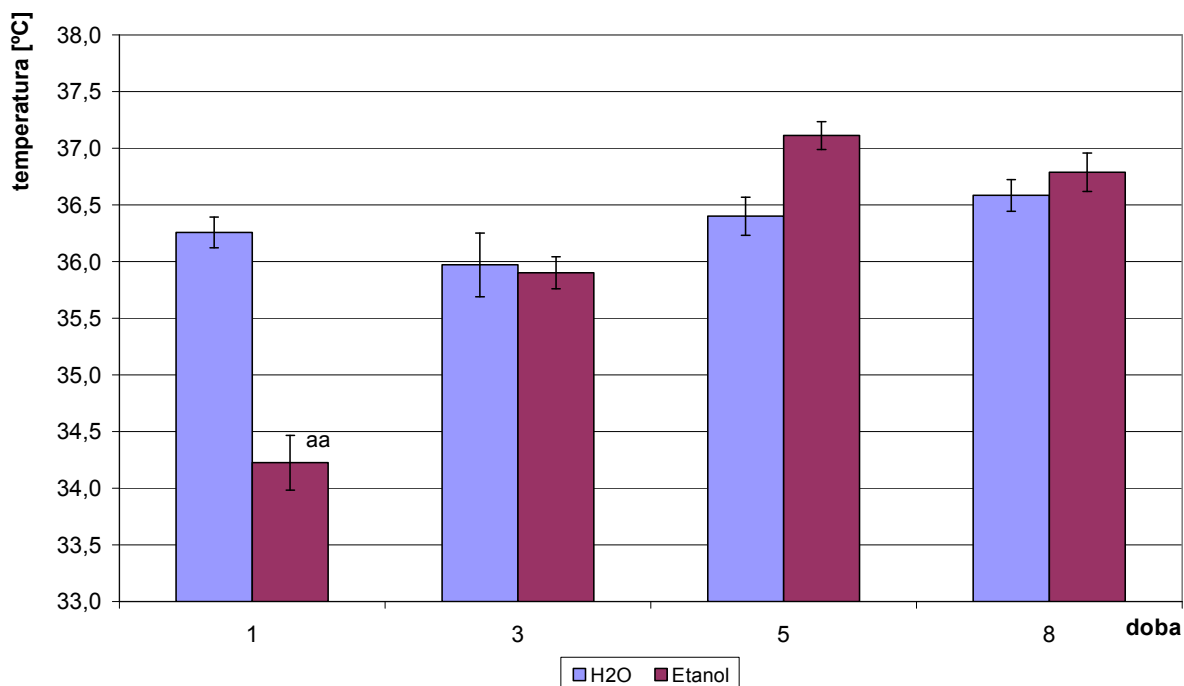
W kolejnym doświadczeniu badano rozwój tolerancji etanolowej u szczurów WHP po wielokrotnym (8x) podaniu etanolu w dawce 3,0 g/kg m.c. i.p. Zaobserwowano, co następuje:

1. W 30 minucie od podania etanolu występuje spadek temperatury ciała zwierząt w stosunku do grupy kontrolnej otrzymującej wodę do wstrzyknięć (Ryc. 16.) (efekt główny – zmiana temperatury, ANOVA z powtórzeniami: $F(1, 12)=6,31$; $p=0,027$); efekt kolejnego podawania (doby) (ANOVA z powtórzeniami: $F(3, 36)=19,7$; $p=0,0000$), interakcja między efektem głównym, a efektem kolejnego podawania (ANOVA z powtórzeniami: $F(3, 36)=11,7$; $p=0,0000$).
2. W 60 minucie od podania etanolu występuje spadek temperatury ciała zwierząt w stosunku do grupy kontrolnej otrzymującej wodę do wstrzyknięć (Ryc. 17.) (efekt główny– zmiana temperatury, ANOVA z powtórzeniami: $F(1, 12)=49,5$; $p=0,0000$); efekt kolejnego podawania (doby) (ANOVA z powtórzeniami: $F(3, 36)=14,0$; $p=0,0000$), interakcja między efektem głównym, a efektem kolejnego podawania (ANOVA z powtórzeniami: $F(3, 36)=17,3$; $p=0,0000$).
3. W 90 minucie od podania etanolu występuje spadek temperatury ciała zwierząt w stosunku do grupy kontrolnej otrzymującej wodę do wstrzyknięć (Ryc. 18.) (efekt główny– zmiana temperatury, ANOVA z powtórzeniami: $F(1, 12)=14,5$; $p=0,0024$); efekt kolejnego podawania (doby) (ANOVA z powtórzeniami: $F(3, 36)=9,30$, $p=0,0001$), interakcja między efektem głównym, a efektem kolejnego podawania (ANOVA z powtórzeniami: $F(3, 36)=10,7$; $p=0,0000$).

Dalsza analiza przy pomocy testu post-hoc wykazała, że za zaobserwowaną zmienność odpowiedzialna była znamienna różnica dla podania etanolu i.p. zmierzona po 30, 60 i 90 minutach od podania w pierwszej dobie (Ryc. 16., Ryc. 17., Ryc. 18.). Ponadto w 3 dobie podawania stwierdzono również istotną różnicę w stosunku do kontroli dla 60 minuty pomiaru (Ryc. 17.). W pozostałych punktach doświadczalnych, tj. w 5 i 8 dobie dla wszystkich punktów pomiarowych oraz dla 3 doby po 30 i 90 minutach od podania zmierzone różnice temperatur pomiędzy grupami otrzymującymi etanol i wodę nie osiągnęły znamienności statystycznej (Ryc. 16., Ryc. 17., Ryc. 18.).

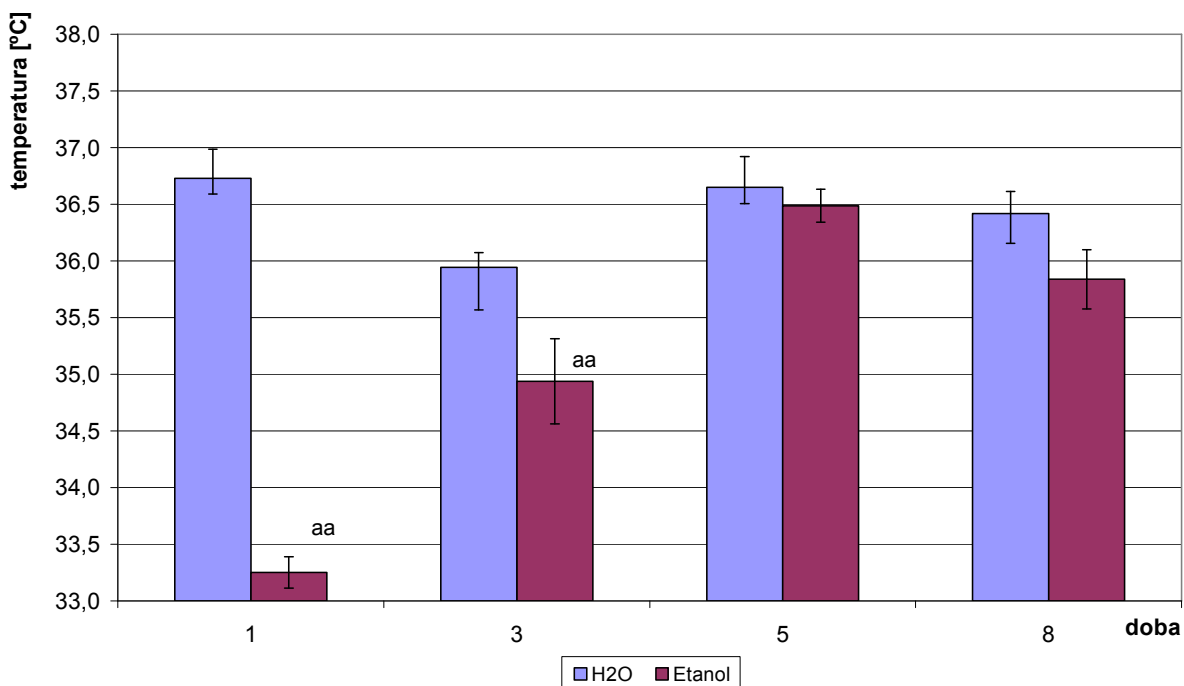
W tym doświadczeniu zmierzono również poziomy greliny po okresie podawania etanolu (8x). Stwierdzono niewielkie, nieistotne statystycznie obniżenie poziomu greliny aktywnej (ANOVA: $F(1, 10)=3,64$; $p=0,0853$) i istotny spadek poziomu greliny całkowitej (ANOVA: $F(1, 11)=30,4$; $p=0,0001$) w stosunku do zwierząt kontrolnych (Ryc. 19.).

Przeprowadzone doświadczenie nie wpłynęło znamienne na zmiany masy ciała użytych zwierząt (ANOVA: $F(1, 13)=0,11$; $p=0,738$) (Tab. 4.).



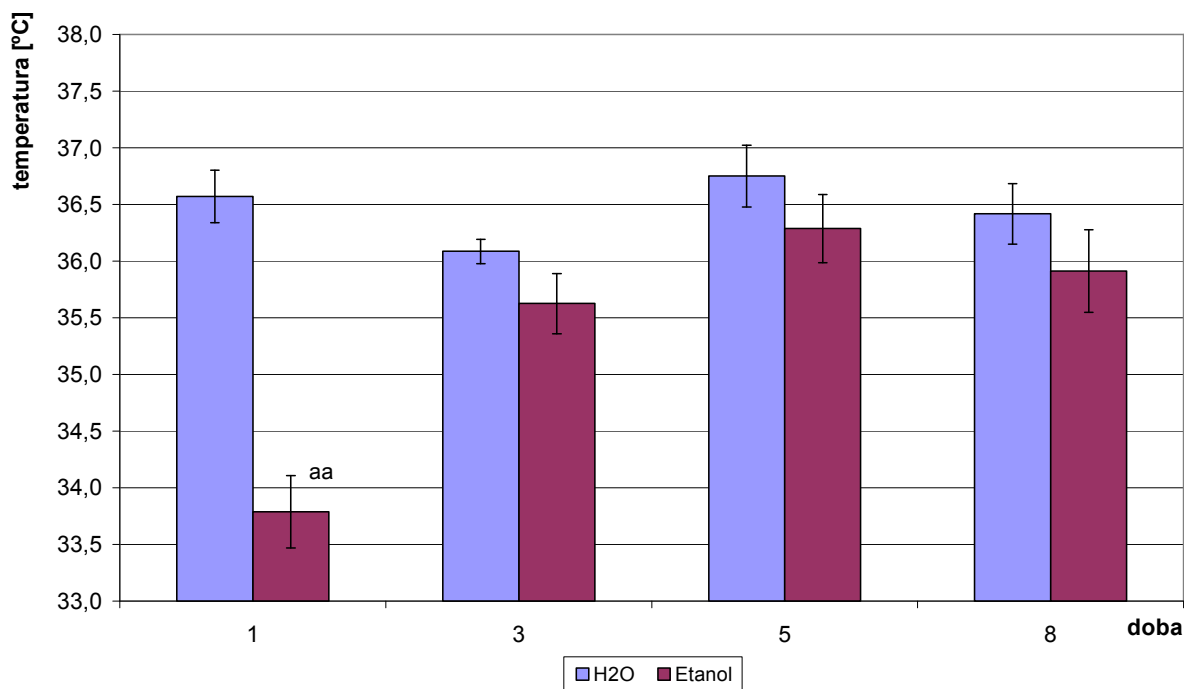
Ryc. 16. Zmiany temperatury ciała u szczurów WHP po 30 minutach od podania etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.) w pierwszej i w kolejnych dobach doświadczenia.

$n=7-8$; $\bar{x} \pm SEM$; aa - względem grupy H2O, $p < 0,0001$



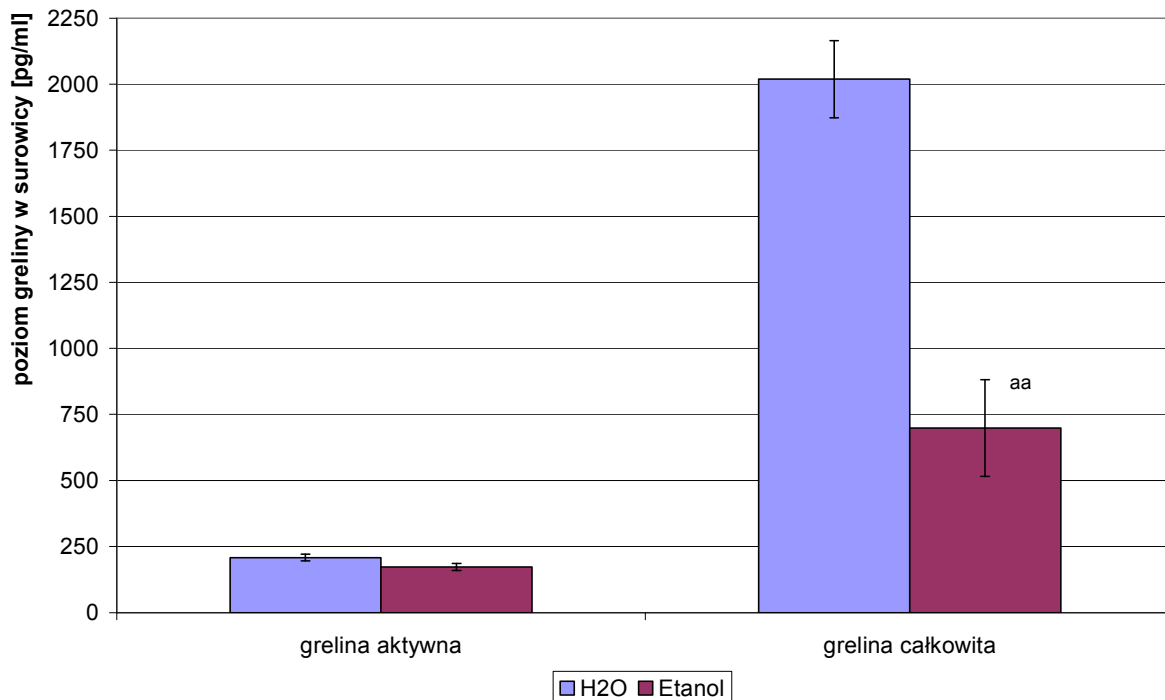
Ryc. 17. Zmiany temperatury ciała u szczurów WHP po 60 minutach od podania etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.) w pierwszej i w kolejnych dobach doświadczenia.

$n=7-8$; $\bar{x} \pm SEM$; aa - względem odpowiedniej grupy H2O, $p < 0,0001$



Ryc. 18. Zmiany temperatury ciała u szczurów WHP po 90 minutach od podania etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.) w pierwszej i w kolejnych dobach doświadczenia.

n=7-8; średnia±SEM; aa – względem grupy H2O, $p<0,0001$



Ryc. 19. Poziomy greliny aktywnej i całkowitej w surowicy u szczurów WHP po wielokrotnym (8x) podaniu etanolu (3,0 g/kg m.c. i.p.).

n=6-8; średnia±SEM; aa - względem grupy H2O, $p<0,0001$

Tab. 4. Zmiany masy ciała użytych szczurów WHP w badaniu rozwoju tolerancji na działanie etanolu.

Grupa	n	Masa [g]
H2O	7	262,9±7,8
Etanol	8	281,3±6,7

średnia±SEM

4.5. Wpływ preferencji na poziomy greliny

4.5.1. Poziomy greliny u szczurów Wistar, NP i PR

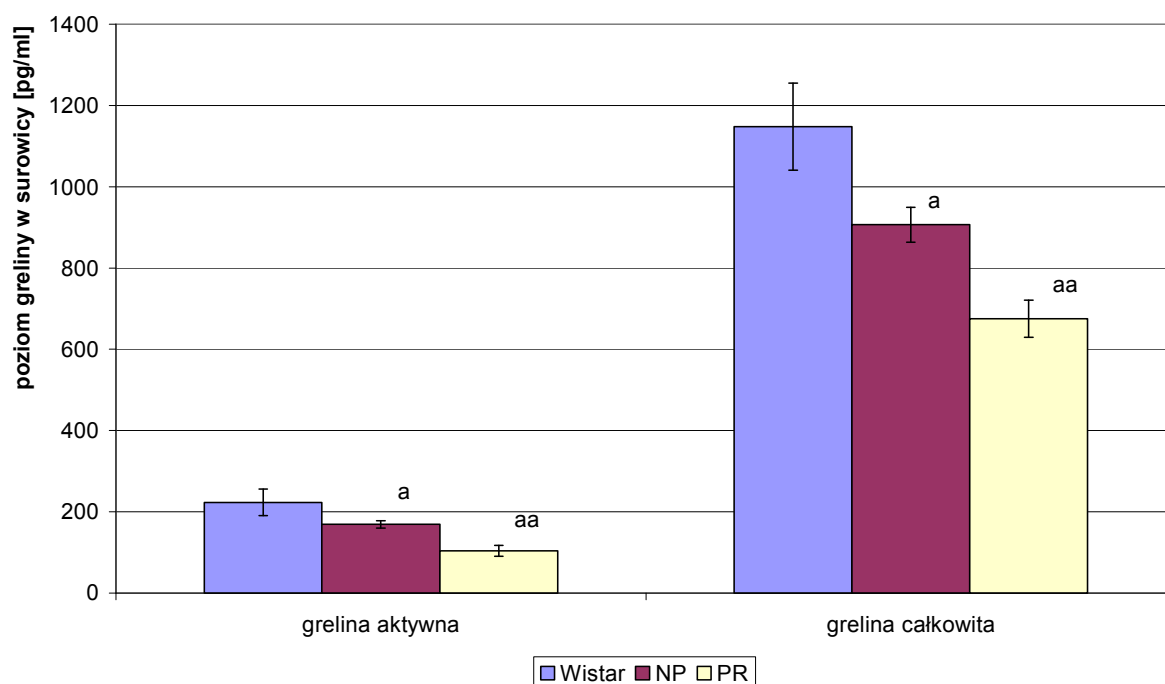
We wstępnych badaniach określono wartości fizjologiczne oraz wpływ preferencji alkoholu lub jej brak u szczurów szczepu Wistar na poziomy greliny aktywnej i całkowitej. Zwierzęta NP PR wyprowadzono ze szczurów Wistar według modelu indukcji przedstawionego w rozdziale 3.1.4. Przeprowadzone doświadczenie pozwoliło zaobserwować, że alkohol przyczynia się do istotnej zmienności zmian wartości fizjologicznych stężeń greliny aktywnej (ANOVA: $F(2, 72)=11,4$; $p=0,0000$) jak i całkowitej (ANOVA: $F(2, 67)=7,84$; $p=0,0009$). Stwierdzono, że zarówno u zwierząt NP pijących niewielkie ilości alkoholu, jak i u zwierząt PR pijących znacznie więcej w stosunku do zwierząt NP (ANOVA: $F(1, 60)=122,7$; $p=0,0000$) (Tab. 5.) obniżenie wartości greliny aktywnej i całkowitej było znamienne w porównaniu do szczurów kontrolnych (Ryc. 20.). Zauważono, że ilość wypijanego alkoholu wyraźnie wpływała na obniżenie obu form greliny tak u szczurów NP jak i PR. Wszystkie zmiany poziomów greliny aktywnej korelowały ze zmianami poziomów greliny całkowitej (Ryc. 20.).

W doświadczeniu wykazano również, że zastosowana procedura alkoholizowania nie wpłynęła istotnie ani na zmiany mas ciała badanych zwierząt (ANOVA: $F(2, 91)=0,308$; $p=0,736$) (Tab. 5.) ani na ilości wypijanych przez nie płynów (ANOVA: $F(2, 90)=2,74$; $p=0,0702$) (Tab. 5.).

Tab. 5. Zmiany masy, ilości wypijanego etanolu oraz sumy wypijanych płynów u szczurów Wistar, (pozbawionych dostępu do alkoholu), niepreferujących (NP) i preferujących (PR) picie alkoholu.

Grupa	n	Masa [g]	Etanol [g/kg m.c./dobę]	suma płynów [ml/kg/d]
Wistar	28	417,1±12,2	-	57,0±2,1
NP	38	423,2±11,5	0,74±0,11	66,4±2,5
PR	24	411,2±8,0	3,11±1,03 ^x	62,2±3,8

średnia±SEM; x - względem grupy NP, $p<0,0001$



Ryc. 20. Poziomy greliny aktywnej i całkowitej u szczurów Wistar, (pozbawionych dostępu do alkoholu), niepreferujących (NP) i preferujących (PR) picie alkoholu.

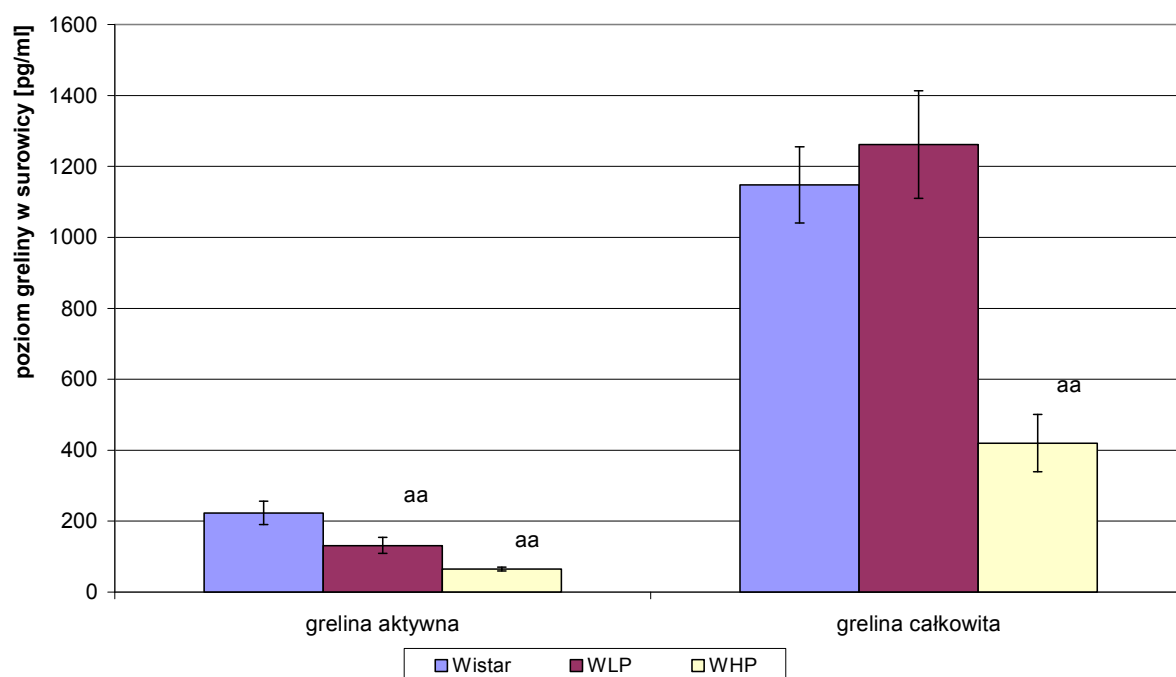
$n = 16-34$; $\bar{x} \pm SEM$; a – wzgl. odpowiedniej grupy Wistar, $p < 0,05$; aa – wzgl. grupy Wistar, $p < 0,001$

4.5.2. Poziomy greliny u szczurów Wistar, WLP i WHP

W tym doświadczeniu szczurom WLP i WHP umożliwiono dostęp do alkoholu (wg wcześniej opisanego modelu doświadczenia, rozdział 3.1.4). Zaobserwowano istotne zmiany poziomu greliny aktywnej (ANOVA: $F(2, 35) = 8,66$; $p = 0,0009$) jak i całkowitej (ANOVA: $F(2, 42) = 7,86$; $p = 0,0013$) u badanych szczurów (Ryc. 21.). Zauważono, że szczury WHP miały znamienne statystycznie obniżone poziomy greliny całkowitej jak i aktywnej tak w stosunku do grupy WLP jak i grupy Wistar ($p < 0,001$). Ponadto szczury WLP miały również znamienne statystycznie obniżone stężenia greliny aktywnej w stosunku do grupy Wistar ($p < 0,001$), podczas gdy dla greliny całkowitej nie zauważono takiej istotności.

W analizowanym układzie doświadczalnym nie stwierdzono istotnych różnic w masach ciała zwierząt (ANOVA: $F(2, 45) = 0,406$; $p = 0,669$) oraz w całkowitej ilości wypijanych przez nie płynów (ANOVA: $F(2, 41) = 0,088$; $p = 0,915$).

Zauważono natomiast istotną różnicę w ilości wypijanego etanolu przez zwierzęta WHP i WLP (ANOVA: $F(1, 15) = 28,7$; $p = 0,0001$) (Tab. 6.).



Ryc. 21. Poziomy greliny aktywnej i całkowitej u szczurów Wistar (pozbawionych dostępu do alkoholu), WLP i WHP (po okresie preferencji).

n= 13-19; średnia±SEM; aa - względem grupy Wistar i/lub WLP, $p<0,001$

Tab. 6. Zmiany masy, ilości wypijanego etanolu oraz sumy wypijanych płynów u szczurów Wistar, (pozbawionych dostępu do alkoholu) oraz szczurów WLP i WHP (po okresie preferencji).

Grupa	n	Masa [g]	Etanol [g/kg m.c./dobę]	suma płynów [ml/kg m.c./dobę]
Wistar	25	422,4±11,2	-	54,0±1,6
WLP	15	430,3±27,4	0,97±0,24	55,5±4,9
WHP	8	428,3±3,2	4,32±0,33 ^x	56,2±3,3

średnia±SEM; x - względem grupy WLP, $p<0,001$

4.5.3. Wpływ picia alkoholu na poziomy greliny u szczurów WLP i WHP

W tej części porównano otrzymane wartości stężeń greliny aktywnej i całkowitej u szczurów WHP i WLP nie poddanych działaniu alkoholu (WHP_H₂O i WLP_H₂O; dane z rozdziału 4.1, Ryc. 9.) oraz szczurów tego samego typu poddanych działaniu alkoholu - po okresie preferencji (WHP_Et i WLP_Et; dane z rozdziału 4.5.2, Ryc. 21.).

Otrzymane dane przedstawiono w tabeli (Tab. 7.). Stwierdzono, że okres preferencji wpłynął znamienne statystycznie na obniżenie stężenia greliny aktywnej w obu grupach szczurów (ANOVA: $F(3, 48)=7,05$; $p=0,0005$). Podobną zmienność zaobserwowano dla zmian stężeń greliny całkowitej (ANOVA: $F(3, 40)=10,1$; $p=0,0000$). Dalsza szczegółowa

analiza pozwoliła stwierdzić, że picie alkoholu przez szczury WHP znamienne obniżyło poziomy greliny aktywnej i całkowitej ($p < 0,05$). Ponadto alkohol w tym układzie wpłynął również na znamienne zmniejszenie stężenia greliny aktywnej u szczurów WLP. Podobny trend choć nieistotny statystycznie stwierdzono dla zwierząt WLP podczas pomiaru greliny całkowitej.

Tab. 7. Wpływ picia alkoholu na zmiany stężenia greliny u szczurów WHP i WLP.

Grupa	n	grelina aktywna [pg/ml]	grelina całkowita [pg/ml]
WLP_H2O	19	181,7±22,6	1314,6±151,3
WLP_Et	13	130,9±19,1 ^x	1261,4±129,4
WHP_H2O	11	89,5±9,1 ^x	690,7±13,1 ^x
WHP_Et	9	64,6±5,4 ^y	419,6±80,6 ^y

średnia±SEM; x - względem grupy WLP_H2O, $p < 0,05$; y-względem grupy WHP_H2O

4.5.4. Porównanie poziomów greliny u szczurów NP, PR, WLP i WHP

W kolejnym doświadczeniu porównano poziomy greliny u szczurów NP, PR, WLP i WHP po okresie preferencji (Ryc. 22., Ryc. 23.). Dane te zebrano w oparciu o wcześniejsze wyniki przedstawione w rozdziale 4.5.1 (Ryc. 20.), i rozdziale 4.5.2 (Ryc. 21.). Zaobserwowano istotną zmienność zarówno dla greliny aktywnej (ANOVA: $F(3, 94)=28,4$; $p=0,0000$) jak i całkowitej (ANOVA: $F(3, 71)=37,0$; $p=0,0000$). Zarówno dla zwierząt PR jak i WHP zaobserwowano znamienne obniżenie wartości greliny aktywnej i całkowitej w stosunku do odpowiednich zwierząt (NP i WLP, $p < 0,0001$) pijących niewielkie ilości etanolu (Ryc. 22., Ryc. 23.). Nie zaobserwowano znamienych różnic między grupami PR i WHP dla obu form greliny. Natomiast u szczurów WLP stwierdzono niższe stężenia greliny aktywnej w stosunku do grupy NP ($p < 0,01$) (Ryc. 22.), podczas gdy dla greliny całkowitej nastąpił wzrost stężenia u szczurów WLP względem NP ($p < 0,01$) (Ryc. 23.).

Wielotygodniowy dostęp z wolnego wyboru do alkoholu zarówno przez szczury Wistar jak i pochodzące z linii wpłynęło znamienne na zróżnicowanie ilości wypijanego alkoholu przez wszystkie zwierzęta (ANOVA: $F(3, 96)=57,6$; $p=0,000$) (Ryc. 24.). Szczury PR wypijały znamienne więcej roztworu 10% etanolu w stosunku do zwierząt NP ($p < 0,001$) oraz analogicznie WHP do WLP ($p < 0,001$). Wprowadzenie jednak procedury alkoholizowania poprzez indukcję zwierząt Wistar i uzyskanie zwierząt NP i PR (rozdział 3.1.4) oraz brak indukcji u zwierząt WHP i WLP nie miało znamienego wpływu na skuteczność otrzymania zwierząt preferujących i niepreferujących w obu modelach (Ryc.

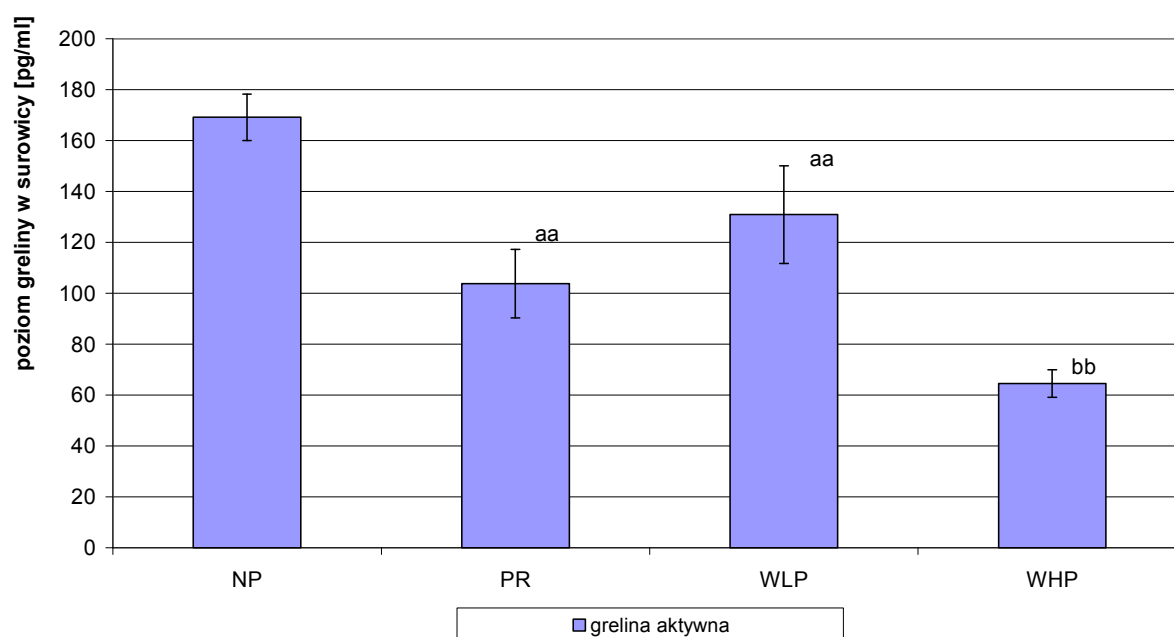
24.). Stwierdzono bowiem, że zwierzęta WHP wypijały podobne ilości alkoholu w porównaniu do zwierząt PR ($p>0,05$) jak i zwierzęta WLP do NP ($p>0,05$).

Zastosowane procedury alkoholizowania zwierząt nie wpłynęły na ich kondycję (Tab. 8.), bowiem nie stwierdzono istotnej zmienności w masach zwierząt (ANOVA: $F(3, 108)=0,927$; $p=0,4292$) oraz nie zaobserwowano różnic w ilości wypijanych przez nie płynów (ANOVA: $F(3, 123)=1,107$; $p=0,3488$).

Tab. 8. Zmiany masy szczurów oraz sumy wypijanych płynów przez zwierzęta NP, PR, WLP i WHP po okresie preferencji.

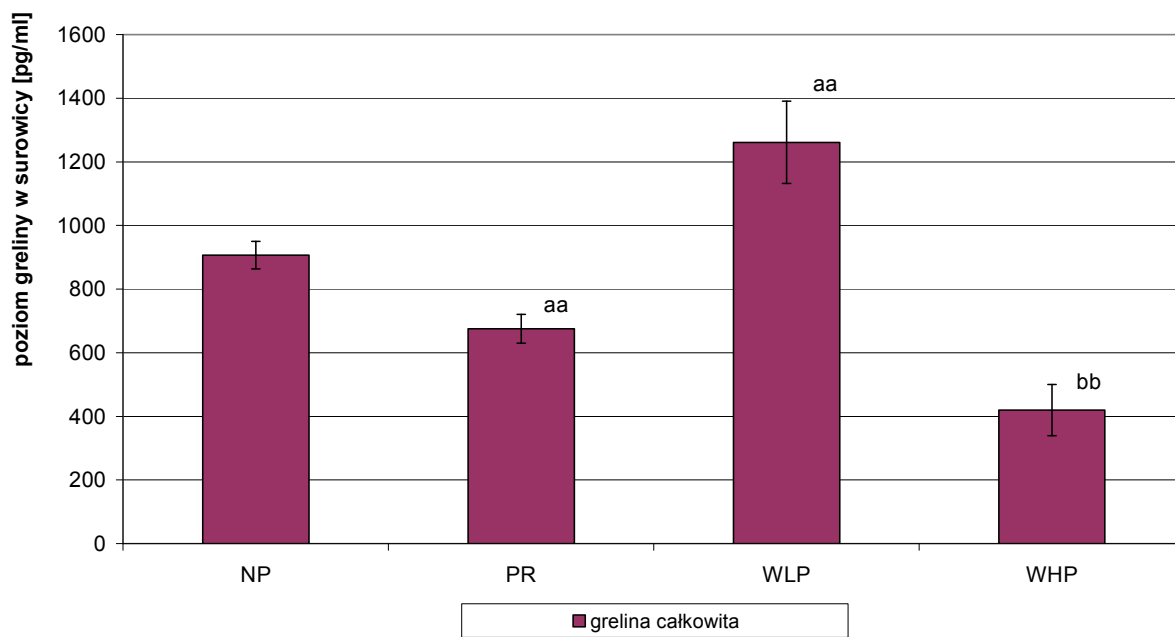
Grupa	n	Masa [g]	Suma płynów [ml/kg m.c./dobę]
NP	37	529,9±11,4	52,4±2,1
PR	42	502,7±11,4	54,4±4,3
WLP	18	516,3±18,1	52,8±3,4
WHP	21	516,9±24,0	53,0±2,5

średnia±SEM

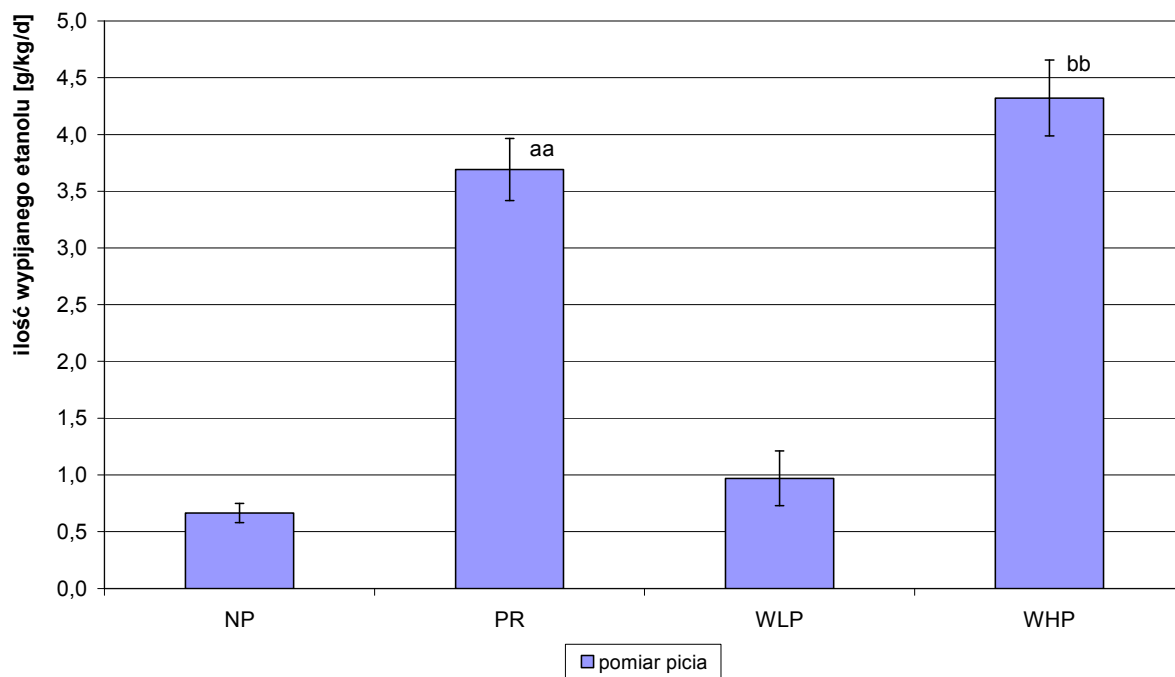


Ryc. 22. Poziomy greliny aktywnej u szczurów NP, PR, WLP i WHP po okresie preferencji picia alkoholu.

$n=13-41$; *średnia±SEM*; aa – względem odp. grupy NP, $p<0,0001$; bb – względem odp. grupy WLP, $p<0,0001$



Ryc. 23. Poziomy greliny całkowitej u szczurów NP, PR, WLP i WHP po okresie preferencji picia alkoholu. $n=13-41$; $\text{średnia} \pm \text{SEM}$; aa – względem odp. grupy NP, $p < 0,0001$; bb – względem odp. grupy WLP, $p < 0,0001$



Ryc. 24. Ilość wypitego etanolu u szczurów NP, PR, WLP i WHP po okresie preferencji picia alkoholu. $n=14-42$; $\text{średnia} \pm \text{SEM}$; aa – względem grupy NP, $p < 0,0001$; bb – względem grupy WLP, $p < 0,0001$

4.6. Wpływ wielokrotnego podania akamprozatu na poziomy greliny

W kolejnym doświadczeniu szczurom szczepu Wistar podawano wielokrotnie (28x) AC dożołądkowo w dawce 500 mg/kg m.c., po okresie preferencji i wynikającym z niego podziale na grupy NP i PR. Stwierdzono, że podawanie AC wpłynęło znamienne na zmienność otrzymanych wyników dla greliny aktywnej (ANOVA: $F(3, 25)=8,051$; $p=0,0006$) jak i całkowitej (ANOVA: $F(3, 31)=6,87$; $p=0,0011$) (Ryc. 25., Ryc. 26.). Zauważono, że poziom greliny aktywnej obniżony przez picie alkoholu u szczurów PR uległ znamienne podwyższeniu do wartości kontrolnej pod wpływem podawania AC ($p<0,001$). Podobnie AC wpłynął na normalizację stężenia greliny całkowitej u zwierząt PR ($p<0,001$). Takiego efektu nie zauważono u szczurów NP.

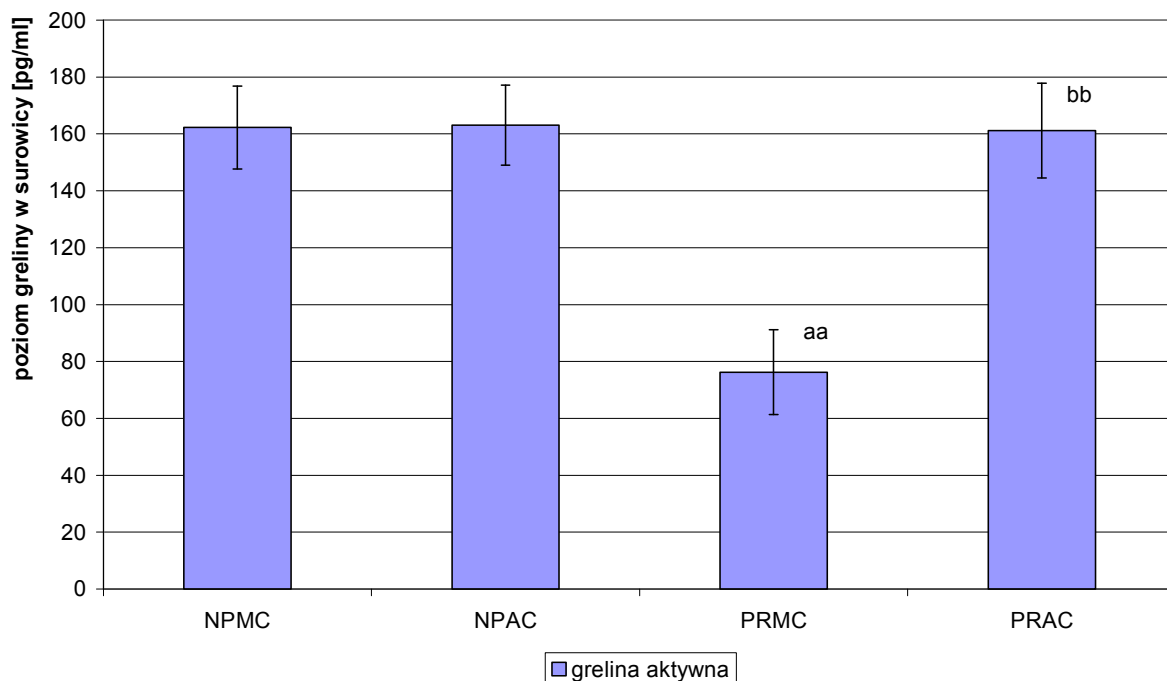
Efekty te korespondowały z wpływem badanego leku na ilość wypijanego etanolu przez zwierzęta PR. Zaobserwowano bowiem, że AC wpłynął istotnie na zmienność ilości wypijanego etanolu (ANOVA: $F(3, 28)=10,8$; $p=0,0001$). Podawanie AC w istotny sposób zmniejszyło ilość wypijanego etanolu przez zwierzęta PR_AC w stosunku do grupy PR_MC ($p<0,001$) (Ryc. 27.).

Jednocześnie stwierdzono, że podawanie AC nie wpłynęło na kondycję zwierząt w tym doświadczeniu (Tab. 9.), bowiem nie stwierdzono zmienności w masach zwierząt (ANOVA: $F(3, 29)=0,316$; $p=0,8196$) oraz sumarycznej ilości wypijanych płynów (ANOVA: $F(3, 29)=0,226$; $p=0,8773$).

Tab. 9. Wpływ akamprozatu na zmianę masy oraz sumaryczną ilość wypijanych płynów przez szczury PR i NP.

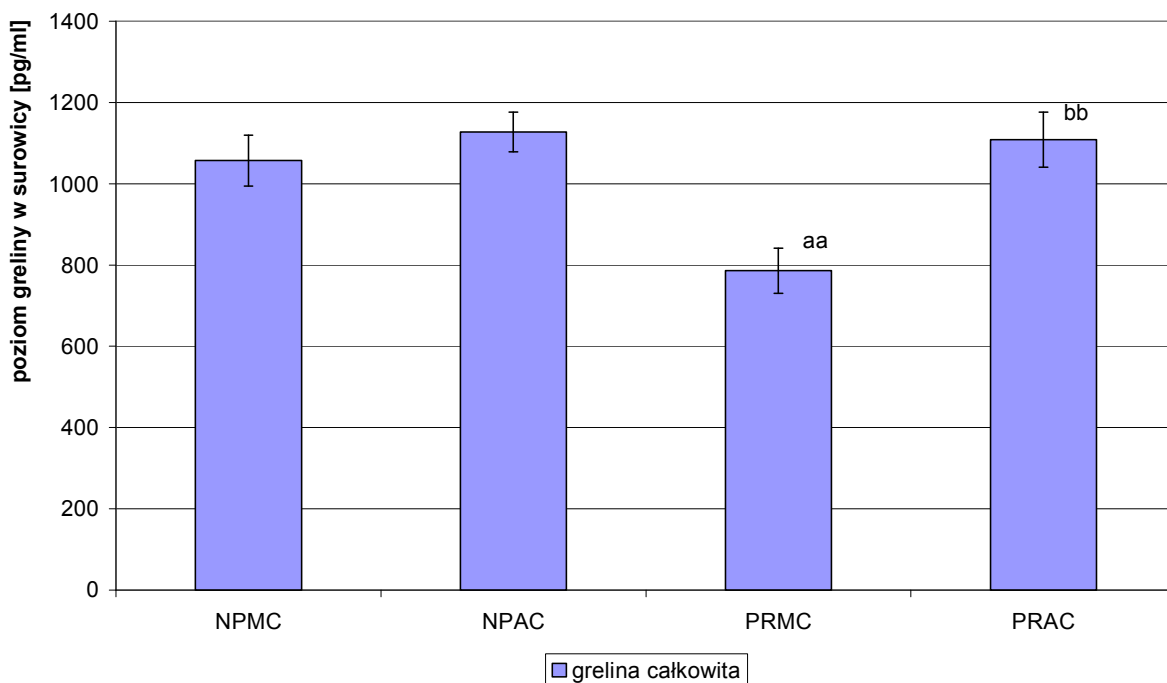
Grupa	n	Masa [g]	suma płynów [ml/kg m.c./dobę]
NP_MC	10	590,5±28,9	86,6±5,7
NP_AC	8	594,4±22,9	80,7±4,6
PR_MC	8	619,4±17,1	80,6±7,2
PR_AC	7	597,1±14,0	83,1±7,4

średnia±SEM



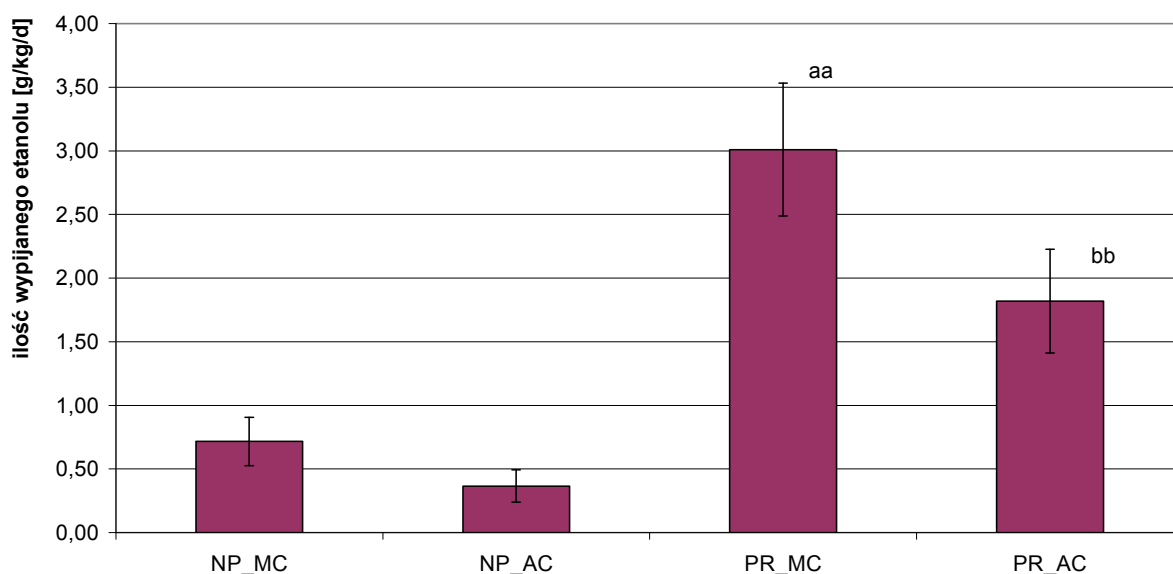
Ryc. 25. Poziom greliny aktywnej w surowicy u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu akamprozatu (500 mg/kg m.c., p.o.).

n=7-10; średnia±SEM; aa - względem NPMC $p<0,001$; bb - względem PRMC $p<0,001$



Ryc. 26. Poziom greliny całkowitej w surowicy u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu akamprozatu (500 mg/kg m.c., p.o.).

n=7-10; średnia±SEM; aa - względem NPMC $p<0,001$; bb - względem PRMC $p<0,001$



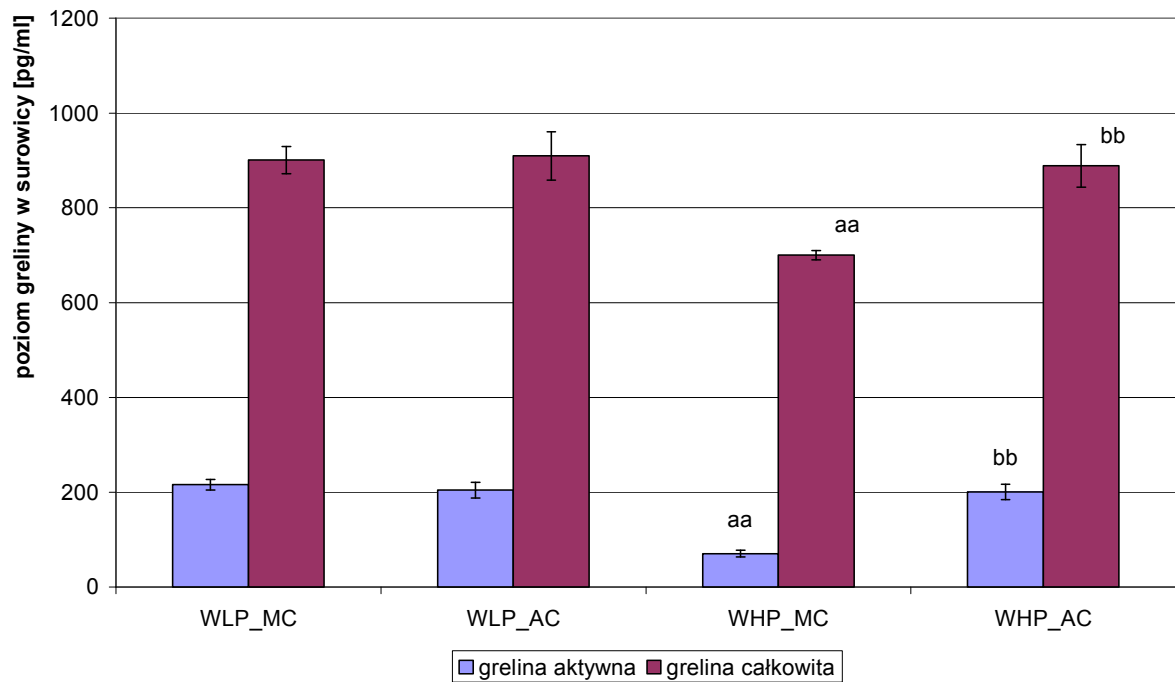
Ryc. 27. Wpływ akamprozatu (500 mg/kg m.c. p.o.) na ilość wypijanego etanolu przez szczury NP i PR.

n=7-10; średnia±SEM; aa - względem grupy NP_MC, $p<0,001$; bb - względem PR_MC, $p<0,001$

W kolejnym doświadczeniu podawano wielokrotnie (28x) AC w dawce 500 mg/kg m.c. p.o. szczurom WLP i WHP. Stwierdzono, że podawanie AC wpłynęło znacząco na zmienność otrzymanych wyników dla greliny aktywnej (ANOVA: $F(3, 25)=27,5$; $p=0,0000$) jak i całkowitej (ANOVA: $F(3, 27)=8,41$; $p=0,0004$) (Ryc. 28.). Szczury WHP miały obniżone stężenia obu form greliny w stosunku do zwierząt WLP ($p<0,001$) (Ryc. 28.). U zwierząt WHP, którym podawano AC stwierdzono wzrost zarówno dla greliny aktywnej jak i całkowitej do poziomu obserwowanego u zwierząt kontrolnych (WLP_MC $p>0,05$) (Ryc. 28.). Takiego efektu AC nie zaobserwowano u szczurów WLP.

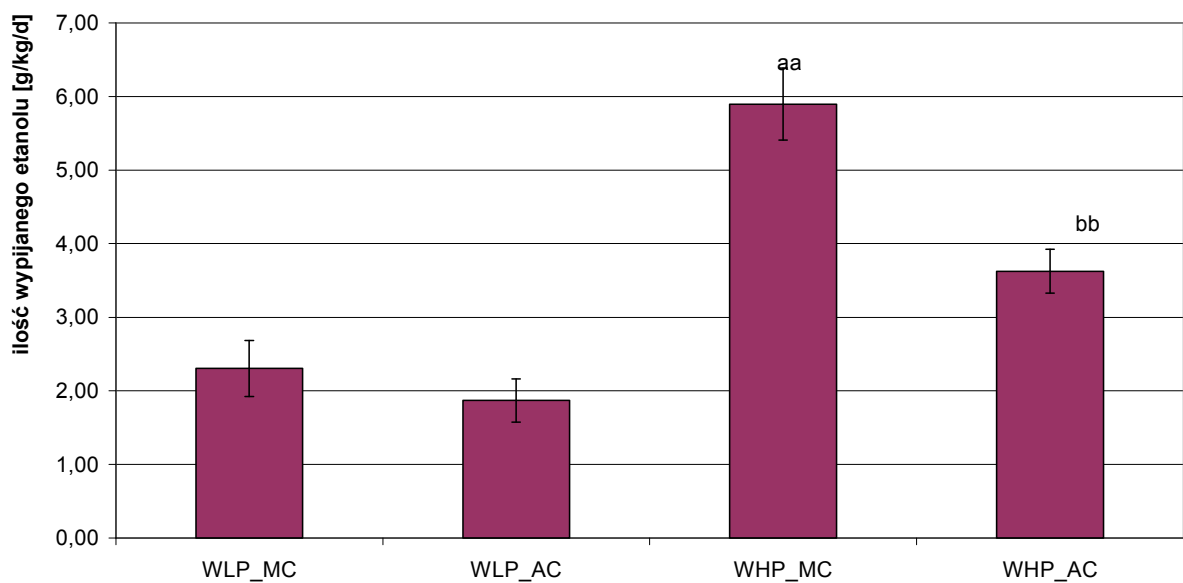
Zaobserwowano, że AC wpłynął istotnie na zmienność ilości wypijanego etanolu (ANOVA: $F(3, 27)=23,8$; $p=0,0000$) (Ryc. 29.). Jednocześnie podawanie AC w istotny sposób zmniejszyło ilość wypijanego etanolu przez zwierzęta WHP_AC w stosunku do grupy WHP_MC ($p<0,05$) (Ryc. 29.).

Podobnie jak poprzednio, stwierdzono, że podawanie AC nie wpłynęło na kondycję zwierząt w doświadczeniu (Tab. 10.), bowiem nie stwierdzono zmienności w masach zwierząt (ANOVA: $F(3, 30)=1,87$; $p=0,1562$) oraz sumarycznej ilości wypijanych płynów (ANOVA: $F(3, 29)=1,36$; $p=0,2740$).



Ryc. 28. Poziom greliny aktywnej i całkowitej w surowicy u szczurów WLP i WHP po wielokrotnym (28x) podaniu akamprozatu (500 mg/kg m.c. p.o.).

$n=6-8$; $\bar{x} \pm SEM$; aa - względem WLP_MC, $p < 0,001$; bb - względem WHP_MC, $p < 0,001$



Ryc. 29. Wpływ akamprozatu (500 mg/kg m.c. p.o.) na ilość wypijanego etanolu przez szczury WLP i WHP.

$n=6-8$; $\bar{x} \pm SEM$; aa - względem WLP_MC, $p < 0,001$; bb - względem WHP_MC, $p < 0,05$

Tab. 10. Wpływ akamprozatu na zmianę masy oraz sumaryczne ilości wypijanych płynów przez szczury WLP i WHP.

Grupa	n	Masa [g]	Suma płynów [ml/kg m.c./dobę]
WLP_MC	8	417,5±12,4	88,8±6,5
WLP_AC	9	417,8±16,7	95,2±7,1
WHP_MC	8	428,7±5,1	79,6±3,7
WHP_AC	9	430,0±12,8	85,2±4,2

średnia±SEM

4.7. Wpływ wielokrotnego podania naltreksonu na poziomy greliny

W kolejnym doświadczeniu podawano wielokrotnie (28x) NAL w dawce 0,1 mg/kg m.c. i.p. szczurom szczepu Wistar. Krew do badań pobierano trzykrotnie (wg metody opisanej w rozdziale 3.1.7) i uzyskano następujące wyniki. Analizie poddano wszystkie zwierzęta, z których później utworzono zwierzęta NP i PR uwzględniając ich podział na otrzymujące lek jak i placebo. Oznaczając wyjściowe wartości u wszystkich zwierząt biorących udział w doświadczeniu nie stwierdzono zmienności między wydzielonymi grupami, zarówno ze względu na stężenia greliny aktywnej (ANOVA: $F(3, 20)=0,439$; $p=0,7276$) jak i całkowitej (ANOVA: $F(3, 17)=1,52$; $p=0,2447$) (Ryc. 30., Ryc. 31.). W kolejnym badaniu u szczurów, którym pobrano krew po okresie preferencji zaobserwowano istotną zmienność zarówno dla greliny aktywnej (ANOVA: $F(3, 22)=43,2$; $p=0,0000$) jak i całkowitej (ANOVA: $F(3, 18)=16,7$; $p=0,0000$). Szczury PR miały znamienne obniżone poziomy obu form greliny w stosunku do zwierząt NP ($p<0,0001$) (Ryc. 30., Ryc. 31.). Po ostatnim pomiarze zauważono, że podawanie NAL istotnie wpłynęło na zmiany greliny aktywnej (ANOVA: $F(3, 22)=22,1$; $p=0,0000$), podczas gdy zmienność pomiędzy wszystkimi grupami dla greliny całkowitej była słabiej zaznaczona (ANOVA: $F(3, 17)=2,26$; $p=0,1182$) (Ryc. 30., Ryc. 31.).

Dalsza analiza pozwoliła wykazać, że NAL istotnie wpłynął na poziom obu form greliny u zwierząt PR (względem grupy otrzymującej placebo PR_H2O, $p<0,001$), prowadząc do wartości nieco wyższych od stężeń obserwowanych u zwierząt nie poddanych działaniu alkoholu ($p<0,05$) (Ryc. 30., Ryc. 31.). Takiego efektu nie zaobserwowano u zwierząt NP.

Efekty te korespondowały z wpływem badanego leku na ilość wypijanego etanolu przez zwierzęta PR (Ryc. 32.). Zaobserwowano bowiem, że NAL wpłynął istotnie na zmienność ilości wypijanego etanolu (ANOVA: $F(3, 24)=13,3$; $p=0,0000$). Podawanie NAL w

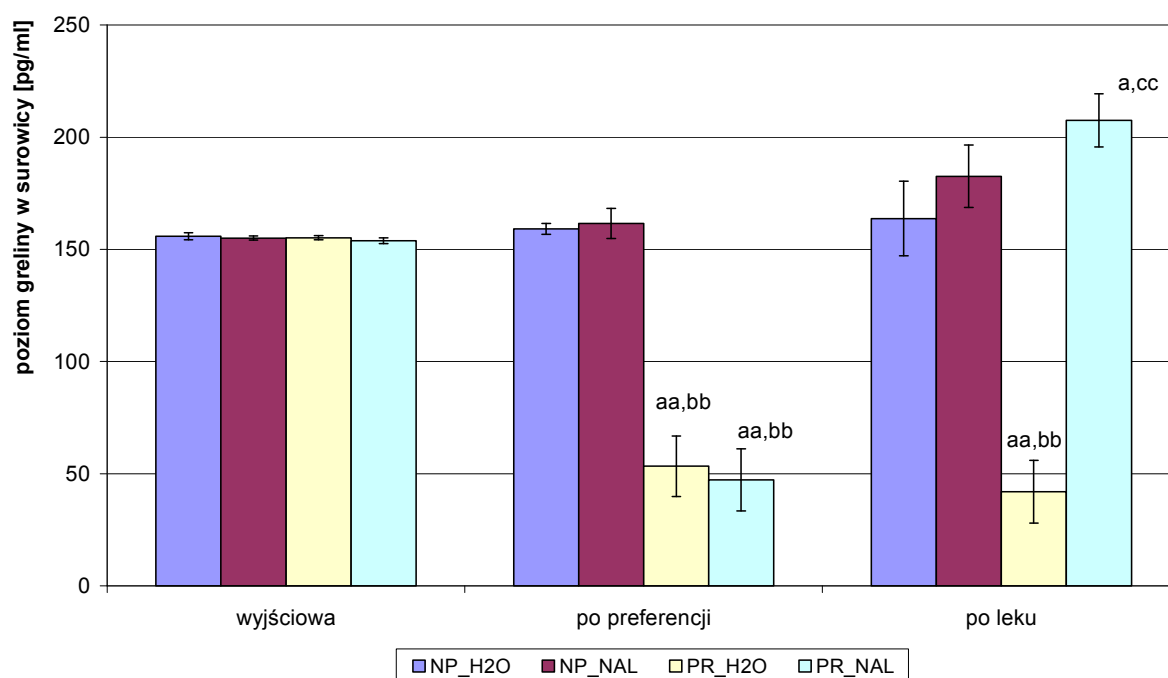
istotny sposób zmniejszyło ilość wypijanego etanolu przez zwierzęta PR_NAL w stosunku do grupy PR_H2O ($p < 0,001$, Ryc. 32.).

Jednocześnie stwierdzono, że podawanie NAL nie wpłynęło na kondycję zwierząt w tym doświadczeniu (Tab. 11.), bowiem nie stwierdzono zmienności w masach zwierząt (ANOVA: $F(3, 24) = 0,601$; $p = 0,6208$) oraz sumarycznej ilości wypijanych płynów (ANOVA: $F(3, 24) = 1,07$; $p = 0,3789$).

Tab. 11. Wpływ naltreksonu na zmiany masy oraz sumaryczne ilości wypijanych płynów przez szczury NP i PR.

Grupa	n	Masa [g]	suma płynów [ml/kg m.c./dobę]
NP_H2O	7	470,7±27,0	64,8±8,8
NP_NAL	7	494,3±14,6	73,3±2,4
PR_H2O	7	469,3±17,6	59,1±4,1
PR_NAL	7	458,6±15,9	68,0±5,8

średnia±SEM

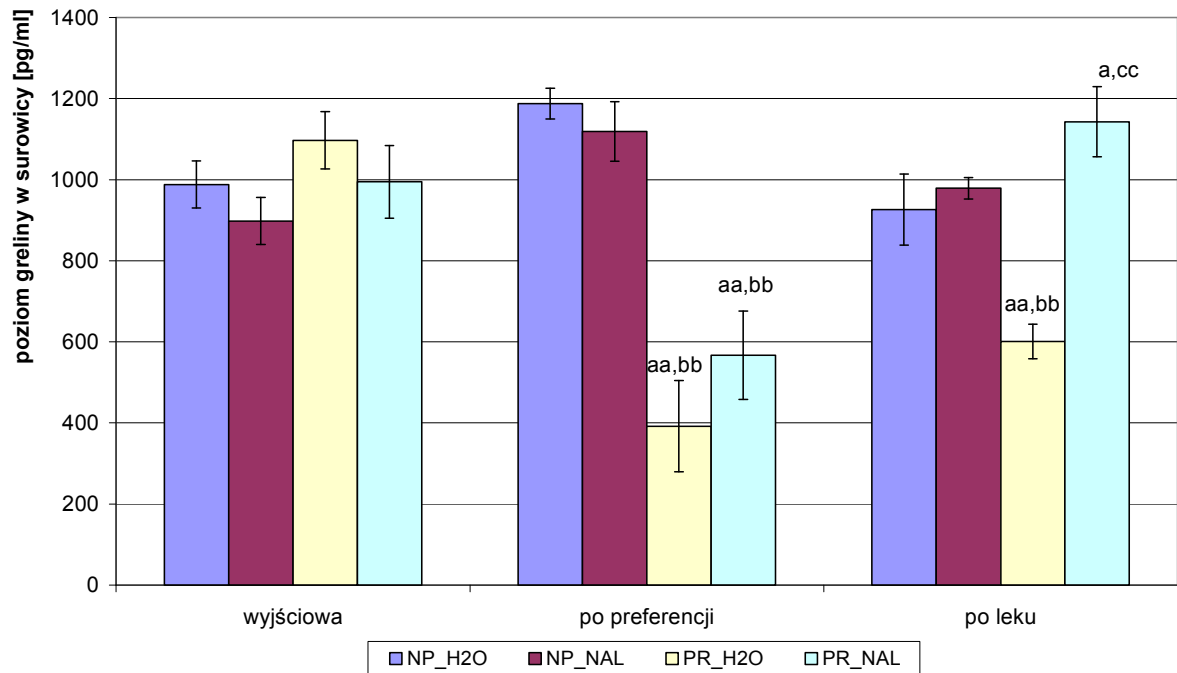


Ryc. 30. Poziom greliny aktywnej w surowicy u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu naltreksonu (0,1 mg/kg m.c. i.p.); przed rozpoczęciem picia (wyjściowa), po okresie picia bez leku (po preferencji), po okresie picia i po leku (po leku).

$n = 6-8$; średnia±SEM;

a – wzgl. odpowiedniej wartości wyjściowej $p < 0,05$ aa – wzgl. odpowiedniej wartości wyjściowej $p < 0,001$;

bb - względem odpowiedniej grupy NP $p < 0,001$; cc – względem grupy PR_H2O $p < 0,001$

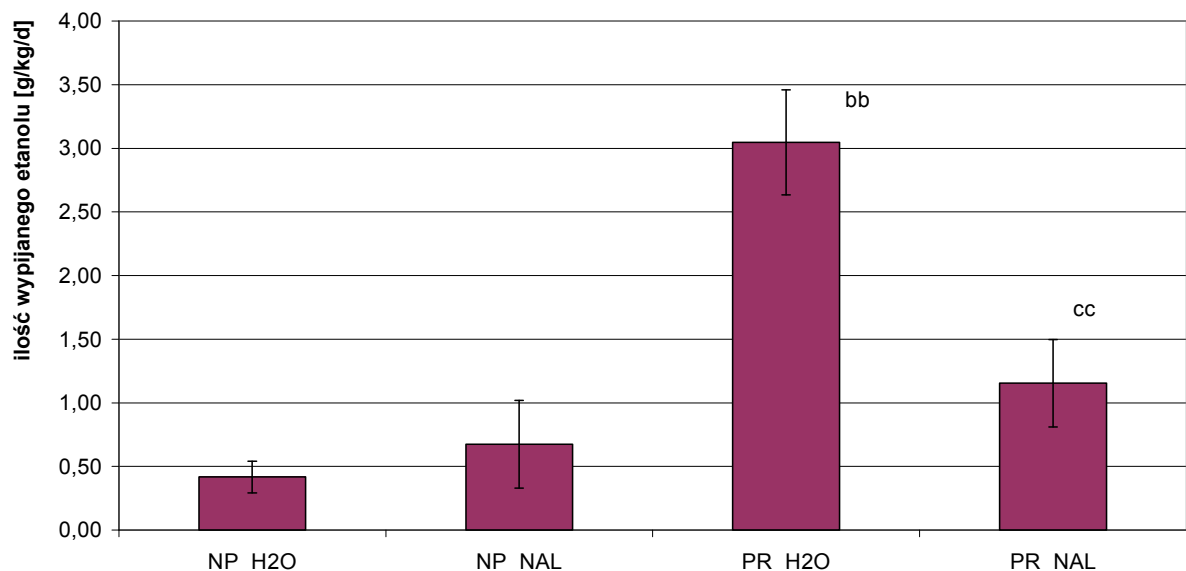


Ryc. 31. Poziom greliny całkowitej w surowicy u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu naltreksonu (0,1 mg/kg m.c. i.p.); przed rozpoczęciem picia (wyjściowa), po okresie picia bez leku (po preferencji), po okresie picia i po leku (po leku).

$n=6-8$; $\text{średnia} \pm \text{SEM}$;

a – wzgl. odpowiedniej wartości wyjściowej $p < 0,05$ *aa* – wzgl. odpowiedniej wartości wyjściowej $p < 0,001$;

bb - względem odpowiedniej grupy NP $p < 0,001$; *cc* – względem grupy PR_H2O $p < 0,001$



Ryc. 32. Wpływ naltreksonu (0,1 mg/kg m.c. i.p.) na ilość wypijanego etanolu przez szczury NP i PR.

$n=6-8$; $\text{średnia} \pm \text{SEM}$; *bb* - względem NP_H2O $p < 0,001$; *cc* - względem PR_H2O $p < 0,001$

4.8. Wpływ wielokrotnego podania kudzu na rozwój tolerancji i poziomy greliny

W kolejnym doświadczeniu badano wpływ dożołądkowego podawania KU w dawce 500 mg/kg m.c./dobę na rozwój tolerancji etanolowej u szczurów WHP po wielokrotnym (8x), dootrzewnowym podaniu etanolu w dawce 3,0 g/kg m.c. W omawianych wynikach wykorzystano dane pochodzące z rozdziału 4.4. Zaobserwowano co następuje:

1. W 30 minucie od podania etanolu występuje obniżenie temperatury ciała zwierząt poddanych działaniu etanolu (Et_MC) w stosunku do grupy kontrolnej otrzymującej wodę do wstrzyknięć (H2O_MC), w przypadku grupy otrzymującej tylko KU (H2O_KU) nie zaobserwowano wpływu samego KU na temperaturę (w stosunku do H2O_MC), natomiast efekt w grupie Et_KU jest wyraźnie zaznaczony (Ryc. 33.) (efekt główny– zmiana temperatury: etanol i KU, ANOVA z powtórzeniami: $F(3, 22)=40,0$; $p=0,0000$); efekt kolejnego podawania (doby) (ANOVA z powtórzeniami: $F(3, 66)=19,2$; $p=0,0000$), interakcja między efektem głównym, a efektem kolejnego podawania (ANOVA z powtórzeniami: $F(9, 66)=5,03$; $p=0,0004$).
2. W 60 minucie od podania etanolu nadal występuje obniżenie temperatury ciała zwierząt Et_MC w stosunku do grupy kontrolnej otrzymującej wodę do wstrzyknięć, dla grupy Et_KU efekt spadku temperatury nadal pozostaje silnie zaznaczony (Ryc. 34.) (efekt główny– zmiana temperatury: etanol i KU, ANOVA z powtórzeniami: $F(3, 22)=57,4$; $p=0,0000$); efekt kolejnego podawania (doby) (ANOVA z powtórzeniami: $F(3, 66)=12,41$; $p=0,0000$), interakcja między efektem głównym, a efektem kolejnego podawania (ANOVA z powtórzeniami: $F(9, 66)=7,73$; $p=0,0000$).
3. W 90 minucie od podania etanolu także widać utrzymującą się niższą temperaturę ciała zwierząt w stosunku do grupy kontrolnej otrzymującej wodę do wstrzyknięć, a wartości dla grupy Et_KU podobnie jak w poprzednich przedziałach czasowych nadal pozostają najniższe (Ryc. 35.) (efekt główny– zmiana temperatury: etanol i KU, ANOVA z powtórzeniami: $F(3, 22)=15,7$; $p=0,0000$); efekt kolejnego podawania (doby) (ANOVA z powtórzeniami: $F(3, 66)=12,1$; $p=0,0000$), interakcja między efektem głównym, a efektem kolejnego podawania (ANOVA z powtórzeniami: $F(9, 66)=5,29$; $p=0,0000$).

Dalsza analiza statystyczna przy pomocy testu post-hoc wykazała, że zaobserwowaną zmienność odpowiedzialna była znamienna różnica ($p<0,001$) pomiędzy

grupami Et_MC i H2O_MC zmierzona po 30, 60 i 90 minutach od podania w pierwszej dobie (Ryc. 33., Ryc. 34., Ryc. 35.). Ponadto w 3 dobie podawania stwierdzono również istotną różnicę Et_MC w stosunku do H2O_MC dla 60 minuty pomiaru ($p < 0,001$) (Ryc. 17.). W pozostałych punktach doświadczalnych, tj. 5 i 8 dobie dla wszystkich punktów pomiarowych oraz dla 3 doby po 30 i 90 minutach od podania zmierzone różnice temperatur pomiędzy grupami otrzymującymi etanol i wodę nie osiągnęły znamienności statystycznej (Ryc. 33., Ryc. 34., Ryc. 35.).

Badając efekt podawania KU, stwierdzono, że u zwierząt z grupy Et_KU w 30 minucie w 3, 5 i 8 dobie temperatura ciała u tych zwierząt była znamienne niższa względem grupy Et_MC ($p < 0,0001$) (Ryc. 33.). Analogiczny efekt obserwowano dla pomiaru w 60 minucie, gdzie istotną statystycznie różnicę uchwyciono już w 1 dobie pomiarów względem grupy Et_MC ($p < 0,0001$) (Ryc. 34.). W 90 minucie efekt działania KU słabnie i jest widoczny jedynie w 3 i 5 dobie względem grupy Et_MC ($p < 0,0001$) (Ryc. 35.).

W tym doświadczeniu zaobserwowano też istotną zmienność w grupach dla wartości greliny aktywnej (ANOVA: $F(3, 21)=5,36$; $p=0,007$) (Ryc. 36.) jak i całkowitej (ANOVA: $F(3, 22)=20,5$; $p=0,0000$) (Ryc. 37.).

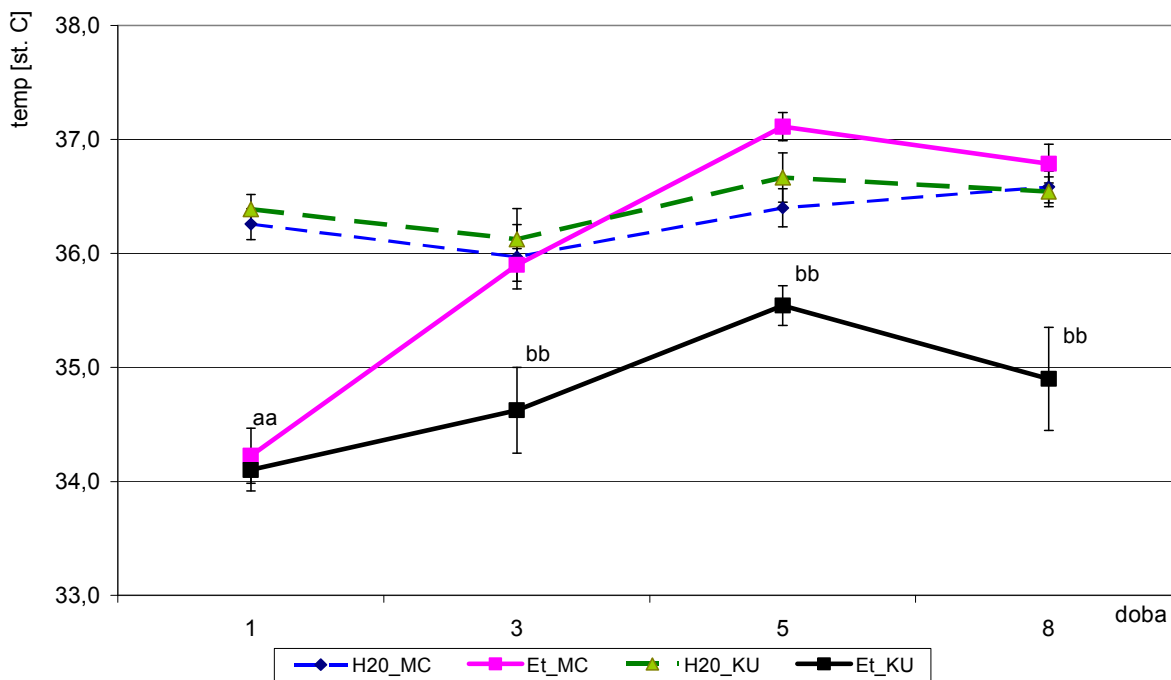
Analiza post-hoc pozwoliła stwierdzić, że po 8 dniach podawania etanolu w grupie Et_MC można zaobserwować istotny spadek wartości greliny aktywnej ($p < 0,05$) oraz całkowitej ($p < 0,001$) w stosunku do grupy H2O_MC. W grupie zwierząt otrzymujących zarówno etanol jak i KU (Et_KU) zaobserwowano silny, statystycznie istotny spadek poziomu greliny aktywnej jak i całkowitej w stosunku do zwierząt kontrolnych z grupy Et_MC ($p < 0,001$) (Ryc. 36.).

Jednocześnie zauważono, że przeprowadzone doświadczenie nie wpłynęło znamienne na zmiany masy ciała użytych zwierząt (ANOVA: $F(3, 27)=1,46$; $p=0,248$) (Tab. 12.).

Tab. 12. Zmiany masy ciała użytych szczurów WHP w badaniu wpływu kudzu na rozwój tolerancji etanolowej.

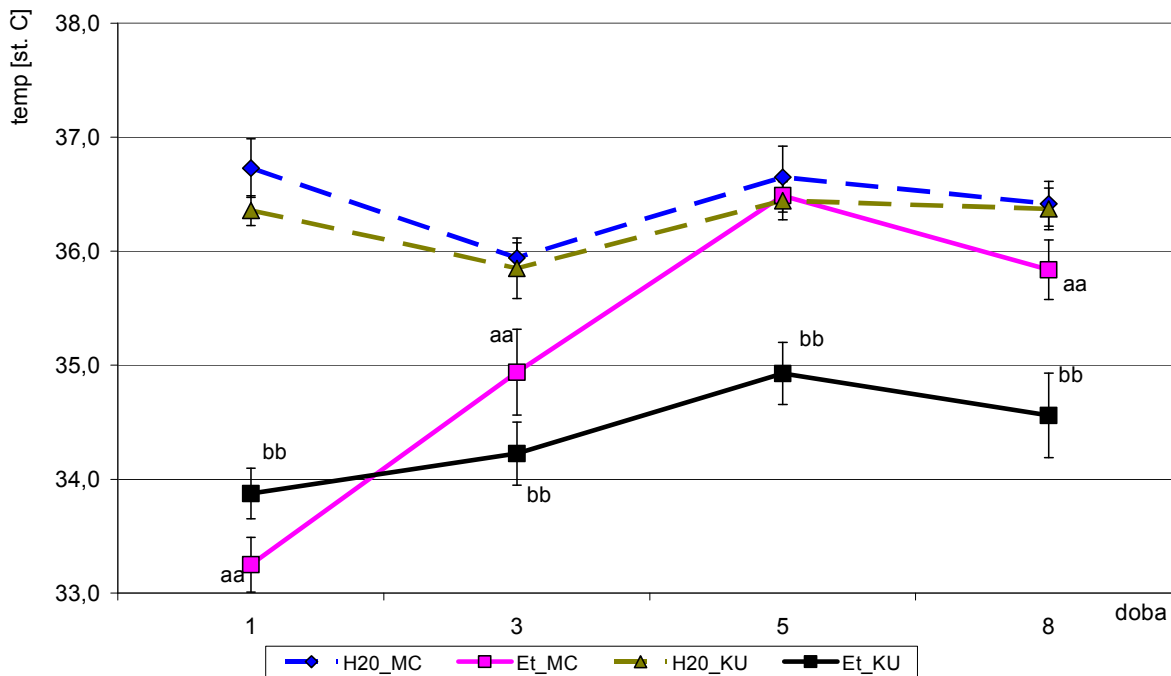
Grupa	n	Masa [g]
H2O+MC	7	262,9±7,8
Et+MC	8	281,3±6,7
H2O+KU	8	267,5±8,2
Et+KU	8	273,8±1,8

Średnia±SEM



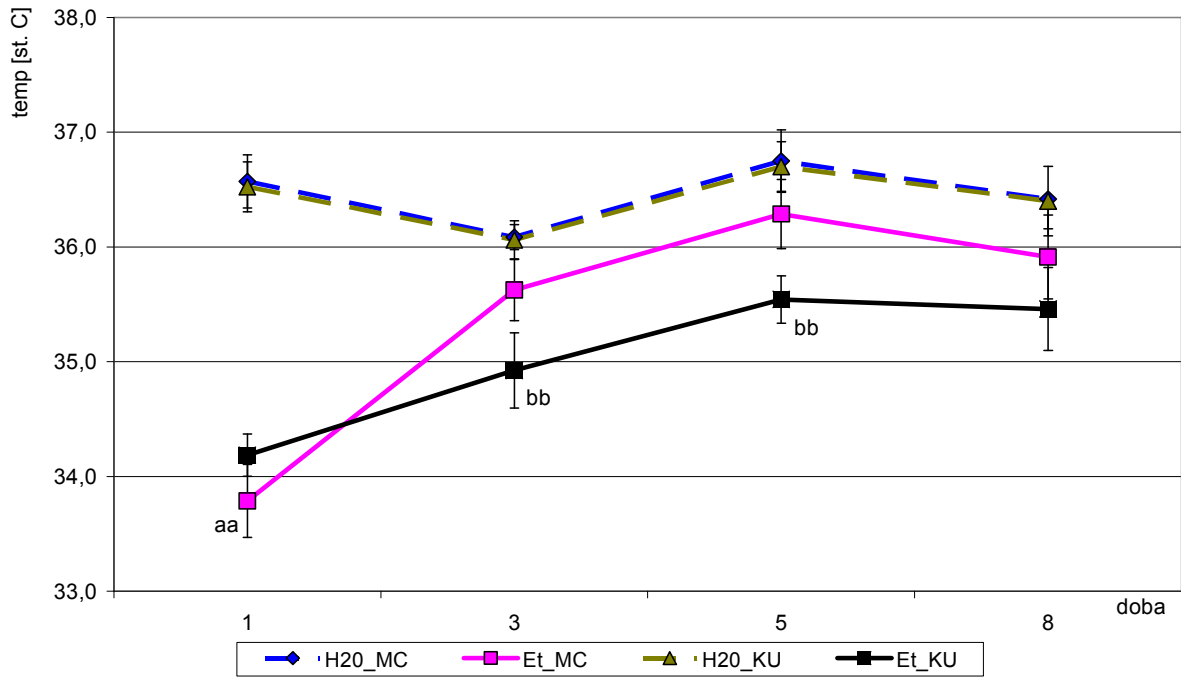
Ryc. 33. Zmiany temperatury ciała u szczurów WHP po 30 minucach od podania etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.) i kudzu (500 mg/kg m.c., p.o.) w pierwszej i w kolejnych dobach doświadczenia.

$n=7-8$; $\bar{x} \pm SEM$; aa - względem grupy H2O_MC, $p < 0,0001$; bb - względem grupy Et_MC, $p < 0,0001$



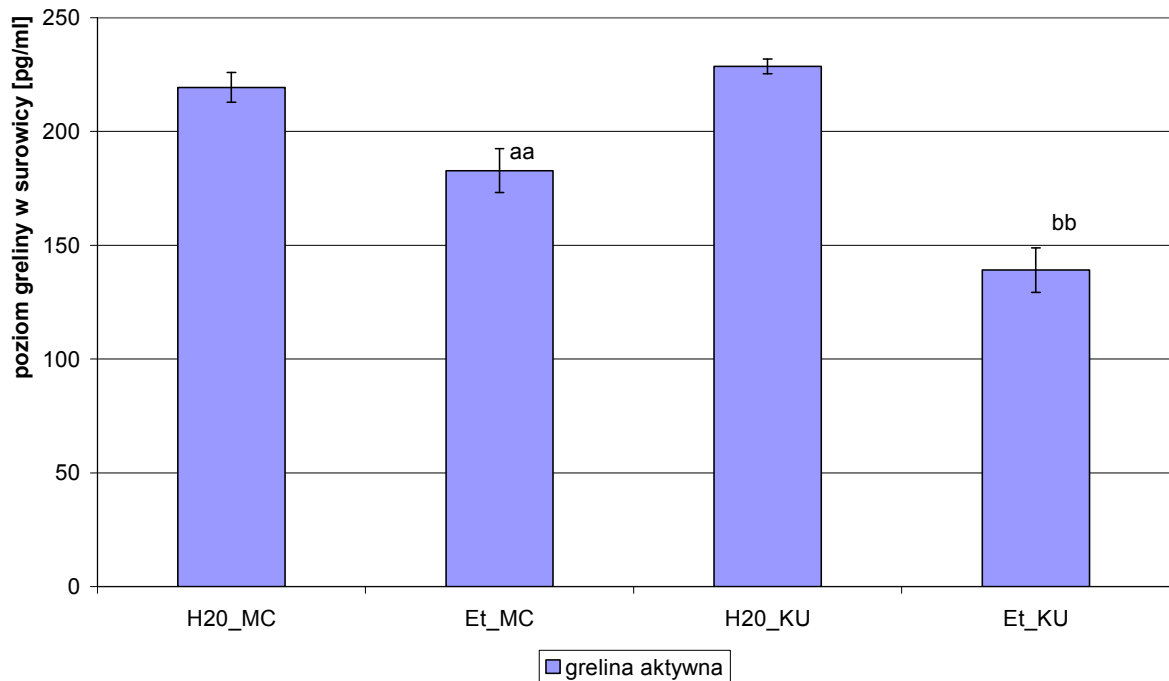
Ryc. 34. Zmiany temperatury ciała u szczurów WHP po 60 minucach od podania etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.) i kudzu (500 mg/kg m.c., p.o.) w pierwszej i w kolejnych dobach doświadczenia.

$n=7-8$; $\bar{x} \pm SEM$; aa - względem grupy H2O_MC, $p < 0,0001$; bb - względem grupy Et_MC, $p < 0,0001$



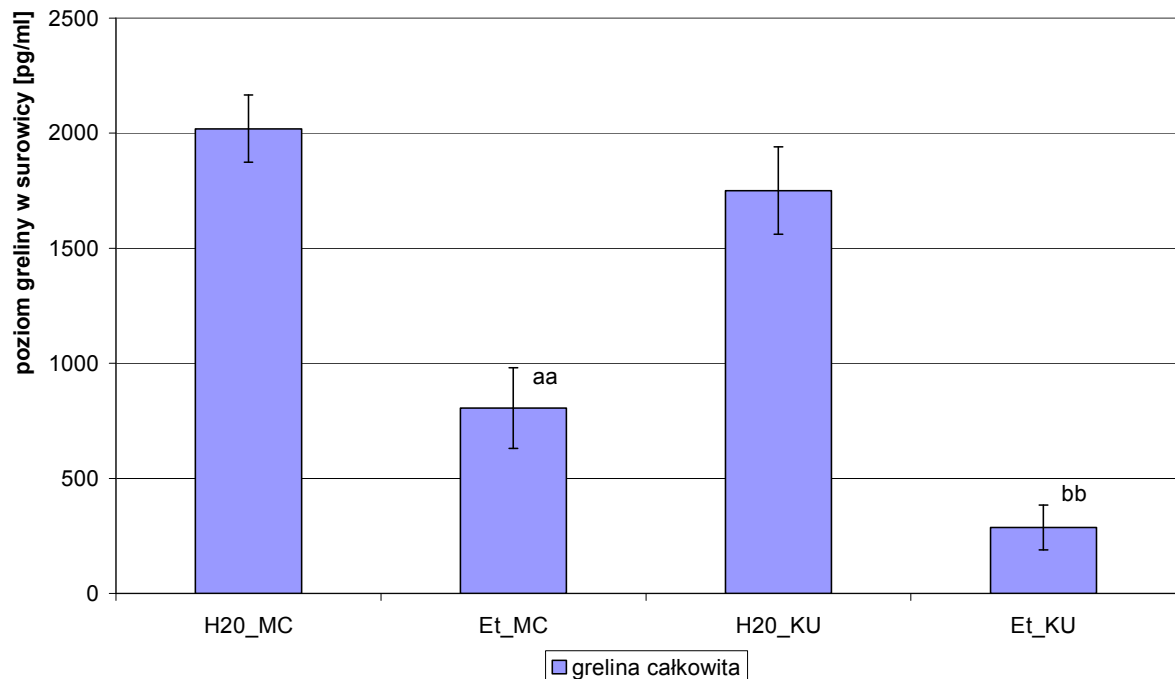
Ryc. 35. Zmiany temperatury ciała u szczurów WHP po 90 minucach od podania etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.) i kudzu (500 mg/kg m.c., p.o.) w pierwszej i w kolejnych dobach doświadczenia.

$n=7-8$; $\bar{x} \pm SEM$; aa - względem grupy H2O_MC, $p < 0,0001$; bb - względem grupy Et_MC, $p < 0,0001$



Ryc. 36. Poziomy greliny aktywnej w surowicy u szczurów WHP po wielokrotnym (8x) podaniu etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.) i kudzu (500 mg/kg m.c., p.o.).

$n=6-8$; $\bar{x} \pm SEM$; aa - względem grupy H2O_MC, $p < 0,05$; bb - względem grupy Et_MC, $p < 0,001$



Ryc. 37. Poziomy greliny całkowitej w surowicy u szczurów WHP po wielokrotnym (8x) podaniu etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.) i kudzu (500 mg/kg m.c., p.o.).

n= 6-8; średnia±SEM; a - względem grupy H2O+MC, $p<0,001$; bb - względem grupy Et_MC, $p<0,001$

4.9. Wpływ wielokrotnego podania kudzu na poziomy greliny

W innym doświadczeniu badano wpływ wielokrotnego podania KU (28x) w dawce 500 mg/kg m.c. p.o. szczurom szczepu Wistar po okresie preferencji i podziale ich na grupy NP i PR. Stwierdzono występowanie istotnej zmienności między grupami dla stężeń greliny aktywnej (ANOVA: $F(3, 28)=5,11$; $p=0,0060$) (Ryc. 38.). Greliny całkowitej nie oznaczono. Dalsza analiza statystyczna wykazała, że u zwierząt preferujących picie etanolu poziom greliny aktywnej był istotnie obniżony (PR_MC względem NP_MC, $p<0,05$). Natomiast u zwierząt preferujących, którym podawano KU zaobserwowano jeszcze niższe stężenia greliny aktywnej (PR_KU względem PR_MC, $p<0,05$) (Ryc. 38.). Takiego efektu nie stwierdzono u szczurów NP.

W tym doświadczeniu zbadano również wpływ KU na ilość wypijanego etanolu przez zwierzęta PR i NP. Na podstawie otrzymanych danych stwierdzono występowanie istotnej zmienności między grupami (ANOVA: $F(3, 28)=86,0$; $p=0,0000$) (Ryc. 39.). Dalsza analiza statystyczna wykazała, że zwierzęta PR_MC piły istotnie więcej alkoholu w stosunku do zwierząt NP_MC ($p<0,001$). Podawanie KU w istotny sposób zmniejszyło ilość wypijanego

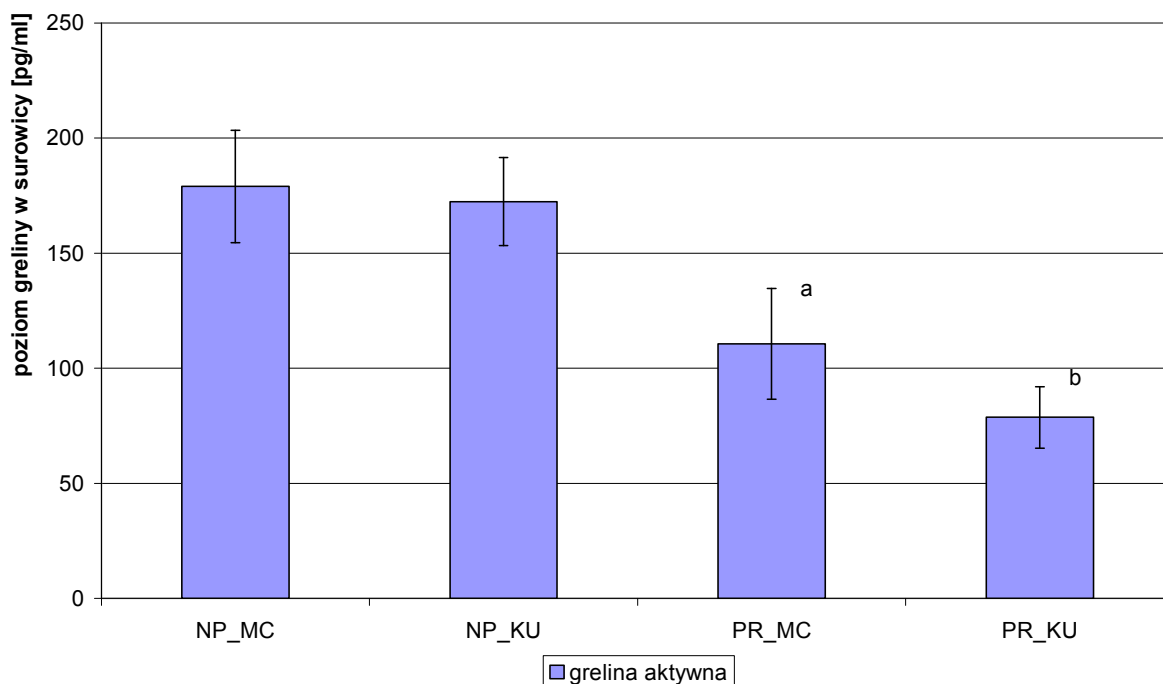
etanolu przez zwierzęta PR_KU w stosunku do grupy PR_MC, jak i przez zwierzęta NP_KU w stosunku do NP_MC ($p < 0,001$) (Ryc. 39.).

Przeprowadzone doświadczenie nie wpłynęło znacząco na kondycję zwierząt (Tab. 13.), bowiem nie stwierdzono istotnej zmienności w masach zwierząt (ANOVA: $F(3, 33) = 0,92$; $p = 0,4414$) oraz nie zaobserwowano różnic w ilości wypijanych przez nie płynów (ANOVA: $F(3, 30) = 0,65$; $p = 0,5857$).

Tab. 13. Zmiany masy ciała oraz suma wypijanych płynów przez szczury NP i PR po wielokrotnym podaniu kudzu.

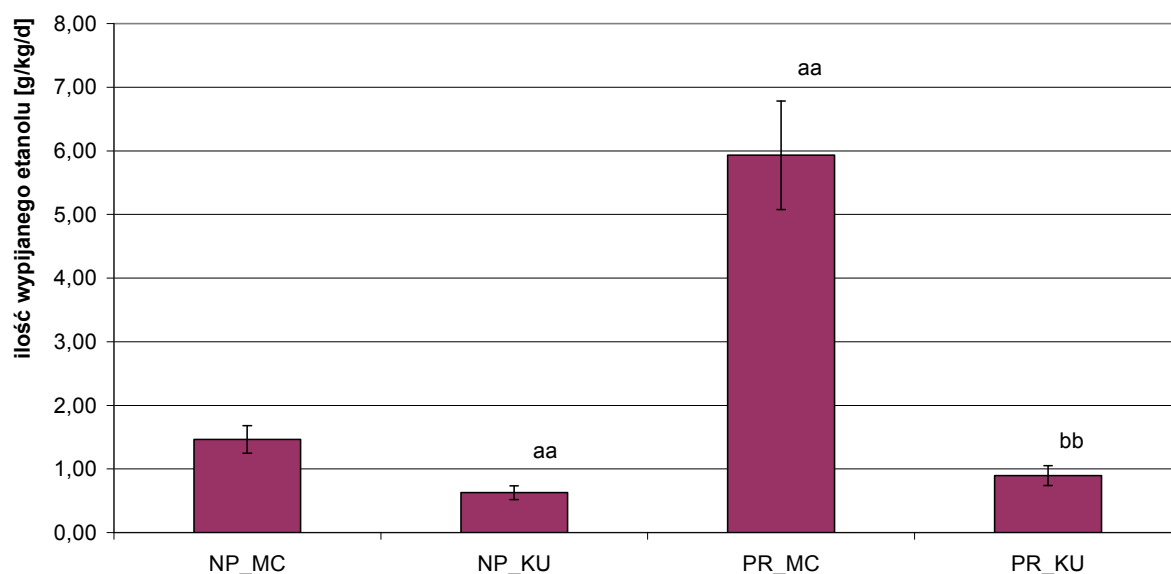
Grupa	n	Masa [g]	Suma płynów [ml/kg m.c./dobę]
NP_MC	8	540,0±18,6	85,8±3,3
NP_KU	11	546,4±17,8	88,8±3,6
PR_MC	9	568,9±25,0	81,7±5,2
PR_KU	9	583,3±20,5	88,7±4,0

średnia±SEM



Ryc. 38. Poziom greliny aktywnej w surowicy u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu kudzu (500 mg/kg m.c. p.o.).

$n = 7-11$; *średnia±SEM*; a - względem grupy NP_MC, $p < 0,05$; b - względem grupy PR_MC, $p < 0,05$



Ryc. 39. Ilość wypijanego etanolu/kg m.c./dobę przez szczury NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu kudzu (500 mg/kg m.c., p.o.).

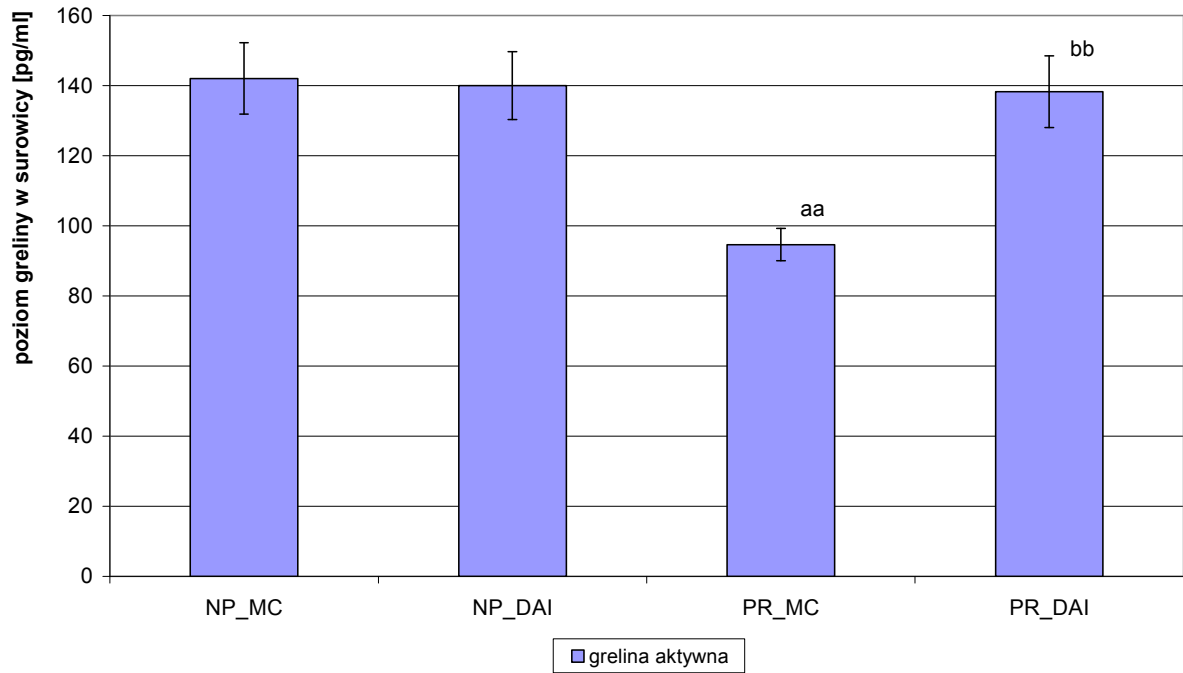
n=7-11; średnia±SEM; aa - względem NP_MC $p<0,001$; bb - względem PR_MC $p>0,001$

4.10. Wpływ wielokrotnego podania daidzyny na poziomy greliny

Zbadano również wpływ wielokrotnego (28x), dożołądkowego podawania DAI (40 mg/kg m.c.) na poziomy greliny u szczurów NP i PR. Stwierdzono, że przeprowadzone doświadczenie miało istotny wpływ na zmienność w poziomach, zarówno greliny aktywnej (ANOVA: $F(3, 31)=6,49$; $p=0,0015$) (Ryc. 40.) jak i całkowitej (ANOVA: $F(3, 30)=9,41$; $p=0,0001$) (Ryc. 41.).

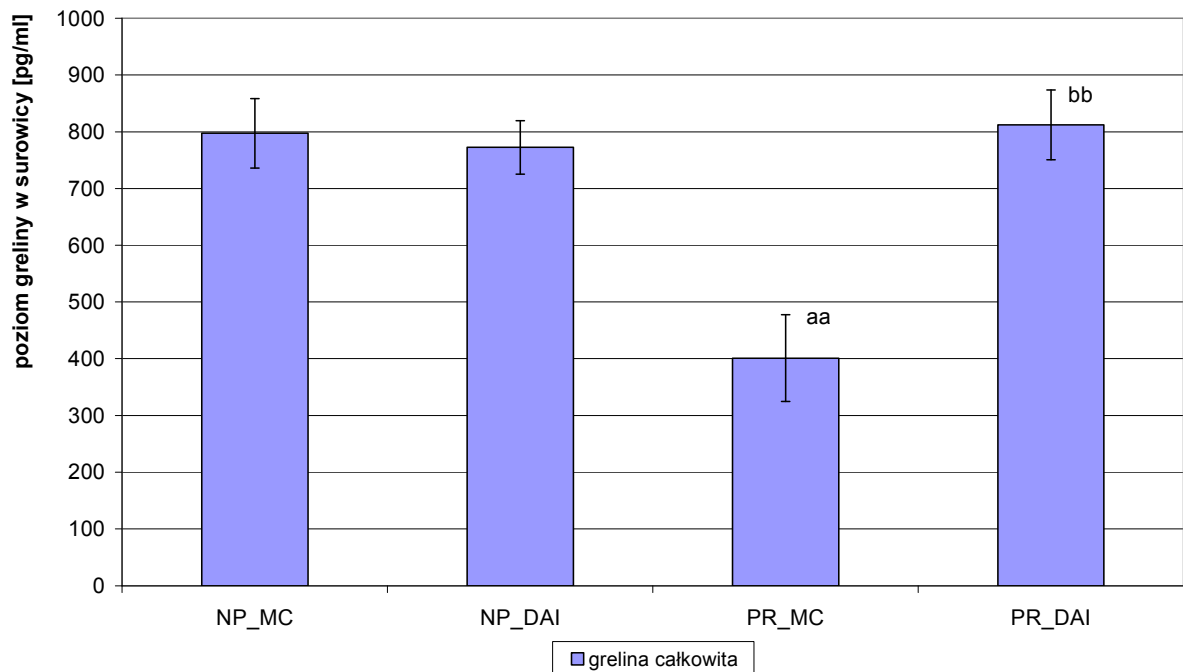
Dalsza analiza statystyczna wykazała, że szczury PR miały znamienne niższe stężenia ($p<0,001$) zarówno greliny aktywnej (Ryc. 40.) jak i całkowitej (Ryc. 41.) w stosunku do zwierząt NP. Podawanie DAI szczurom PR wpłynęło w istotny sposób na podwyższenie stężeń obu form greliny ($p<0,001$) prowadząc do wartości obserwowanych u szczurów NP_MC (Ryc. 40., Ryc. 41.). Natomiast zastosowany izoflawonoid nie zmienił wartości stężenia tak greliny całkowitej jak i aktywnej u zwierząt NP.

Zbadano również wpływ DAI na ilość wypijanego etanolu przez zwierzęta NP i PR w tym samym doświadczeniu (Ryc. 42.). Na podstawie otrzymanych wyników zaobserwowano występowanie statystycznie istotnej zmienności między grupami (ANOVA: $F(3, 33)=9,81$; $p=0,0000$).



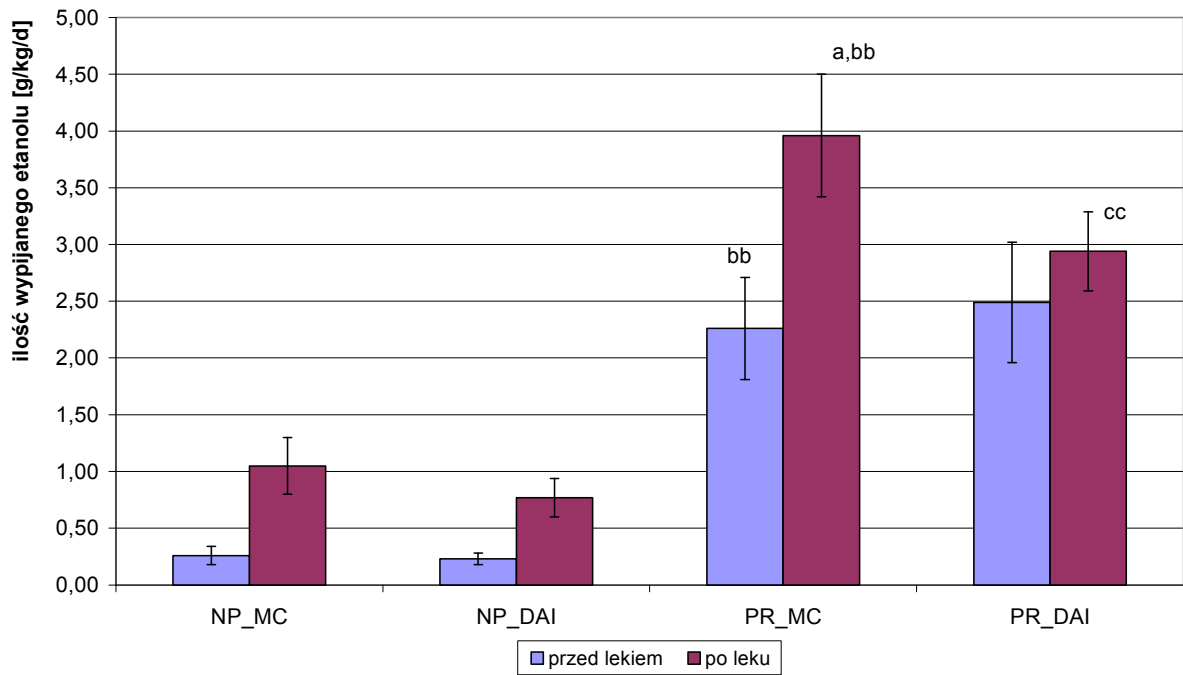
Ryc. 40. Poziom greliny aktywnej w surowicy u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podawaniu daidzyny (40 mg/kg m.c. p.o.).

n=8-11; średnia±SEM; aa - względem NP_MC $p<0,001$; bb - względem PR_MC $p<0,001$



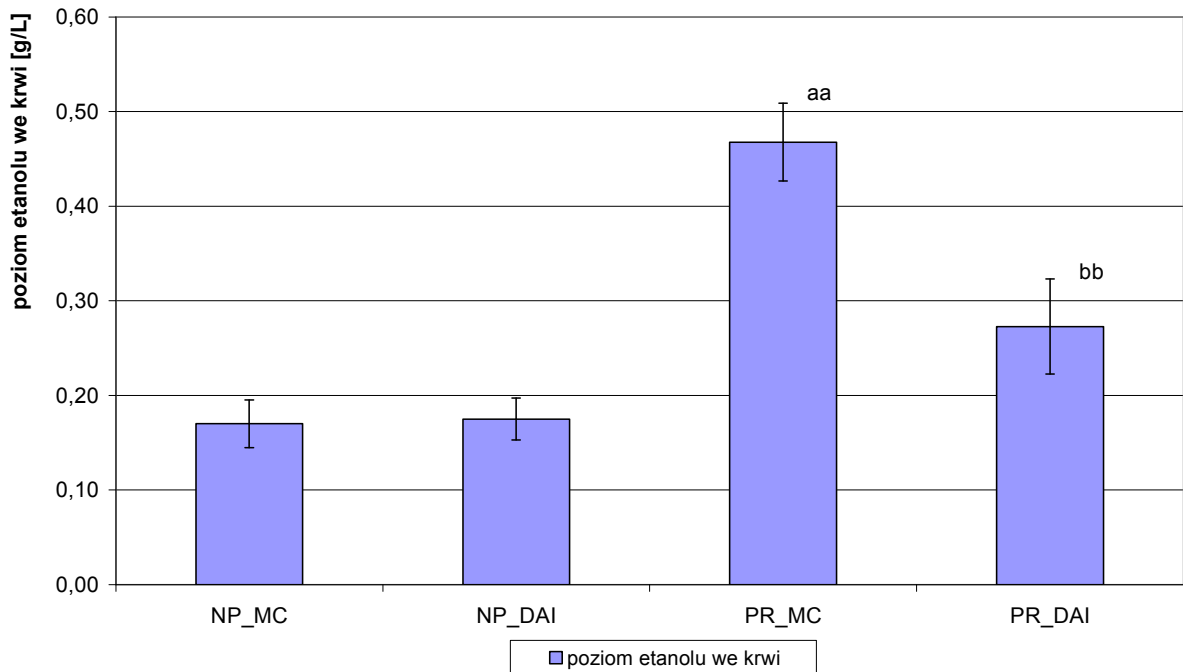
Ryc. 41. Poziom greliny całkowitej w surowicy u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu daidzyny (40 mg/kg m.c. p.o.).

n=8-11; średnia±SEM; aa - względem NP_MC $p<0,001$; bb - względem PR_MC $p<0,001$



Ryc. 42. Ilość wypitego etanolu/kg m.c./dobę u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu daidzyny (40 mg/kg m.c. p.o.).

n=8-11; średnia±SEM; aa - względem pomiaru NP_MC, $p<0,001$; bb - względem PR_MC, $p<0,001$



Ryc. 43. Poziomy alkoholu we krwi u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu daidzyny (40 mg/kg m.c. p.o.).

n=8-11; średnia±SEM; aa - względem NP_MC $p<0,001$; bb - względem PR_MC $p<0,001$

Dalsza analiza wykazała, że zwierzęta PR_MC piły znacznie więcej alkoholu w porównaniu do zwierząt NP_MC ($p < 0,001$). Podawanie DAI szczurom PR (PR_DAI) spowodowało istotne zmniejszenie ilości wypijanego etanolu w stosunku do grupy PR_MC ($p < 0,001$) (Ryc. 42). Nie stwierdzono natomiast wpływu DAI na picie alkoholu przez zwierzęta NP.

Po zakończonym doświadczeniu zmierzono poziomy etanolu we krwi wszystkich badanych grup zwierząt (Ryc. 43.). Na podstawie otrzymanych wyników zaobserwowano występowanie istotnej zmienności między grupami (ANOVA: $F(3, 20)=10,63$; $p=0,0002$). Dalsza analiza wykazała, że szczury PR_MC miały znacznie wyższe stężenia etanolu w stosunku do zwierząt NP_MC ($p < 0,001$) (Ryc. 43.). Zaobserwowano również, że DAI w istotny sposób zmniejszała poziomy etanolu u zwierząt PR w stosunku do zwierząt PR_MC ($p < 0,001$). Nie stwierdzono takiego efektu DAI u szczurów NP.

Przeprowadzone doświadczenie nie wpłynęło znacząco na kondycję zwierząt (Tab. 14.), bowiem nie stwierdzono istotnej zmienności w masach zwierząt (ANOVA: $F(3,34)=1,6465$; $p=0,19692$) oraz nie zaobserwowano różnic w ilości wypijanych przez nie płynów (ANOVA: $F(3, 33)=1,1460$; $p=0,34501$).

Tab. 14. Zmiany masy ciała oraz suma wypijanych płynów przez szczury Wistar po wielokrotnym podawaniu daidzyny.

Grupa	n	Masa [g]	Suma płynów [ml/kg m.c./dobę]
NP_MC	9	596,7±16,3	67,6±4,2
NP_DAI	8	578,2±21,6	68,0±3,5
PR_MC	10	552,5±21,7	61,5±3,1
PR_DAI	11	545,4±14,6	61,4±2,7

średnia±SEM

4.11. Wpływ wielokrotnego podania pueraryny na poziomy greliny

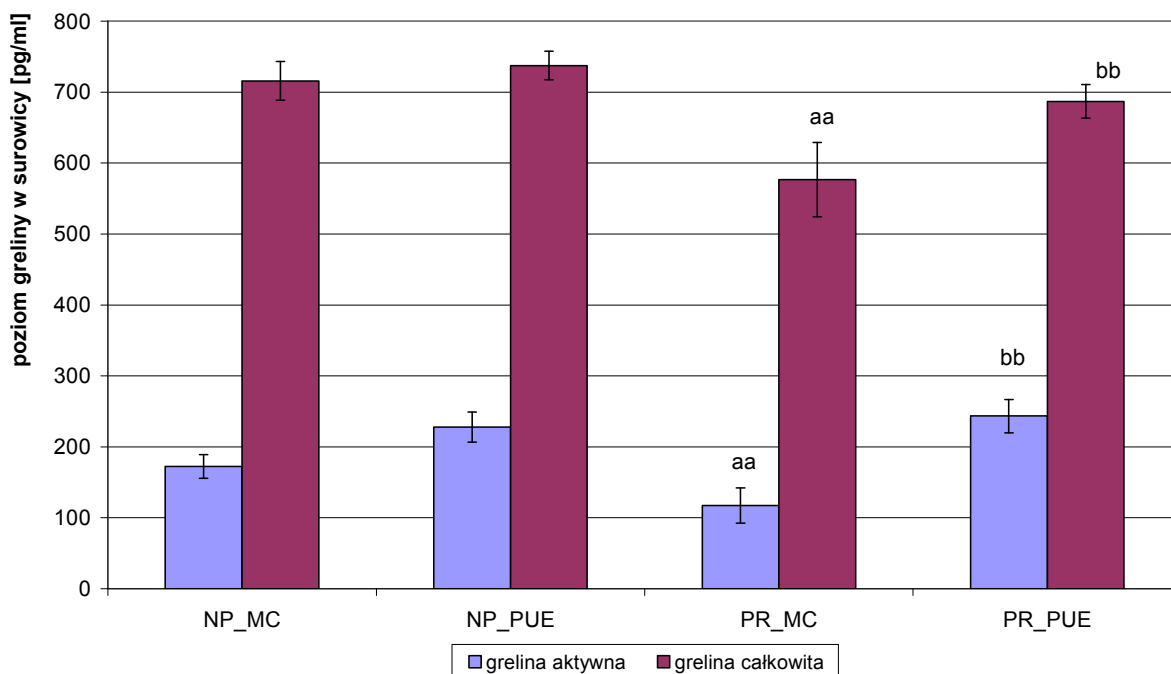
Zbadano również wpływ wielokrotnego podawania PUE w dawce 150 mg/kg m.c. p.o. na poziomy greliny aktywnej i całkowitej u szczurów NP i PR (Ryc. 44.). Na podstawie otrzymanych wyników zaobserwowano występowanie statystycznie istotnej zmienności między grupami tak dla greliny aktywnej (ANOVA: $F(3, 37)=6,96$; $p=0,0007$) jak i całkowitej (ANOVA: $F(3, 34)=4,82$; $p=0,0066$). Dalsza analiza statystyczna ujawniła, że zwierzęta PR_MC posiadały istotnie statystycznie niższe poziomy greliny aktywnej jak i całkowitej ($p < 0,001$) względem odpowiedniej grupy kontrolnej NP_MC (Ryc. 44.). Podawanie PUE

zwierzętom PR powoduje wzrost stężenia obu form greliny w stosunku do zwierząt PR_MC ($p < 0,001$) (Ryc. 44.) a otrzymane wartości są zbliżone do zmierzonych u zwierząt typu NP_MC ($p > 0,05$). Takiego efektu zastosowanego izoflawonoidu nie zaobserwowano u szczurów NP_PUE w stosunku do zwierząt NP_MC ($p > 0,05$).

Zbadano również wpływ PUE na ilość wypijanego etanolu przez zwierzęta NP i PR w tym samym doświadczeniu (Ryc. 45.). Na podstawie otrzymanych wyników zaobserwowano występowanie statystycznie istotnej zmienności między grupami (ANOVA: $F(3, 40) = 25,1$; $p = 0,0000$).

Dalsza analiza wykazała, że zwierzęta PR_MC piły znacznie więcej alkoholu w porównaniu do zwierząt NP_MC ($p < 0,001$) (Ryc. 45.). Podawanie PUE szczurom PR (PR_PUE) spowodowało istotne zmniejszenie ilości wypijanego etanolu w stosunku do grupy PR_MC ($p < 0,001$) (Ryc. 45.). Nie stwierdzono natomiast wpływu PUE na picie alkoholu przez zwierzęta NP.

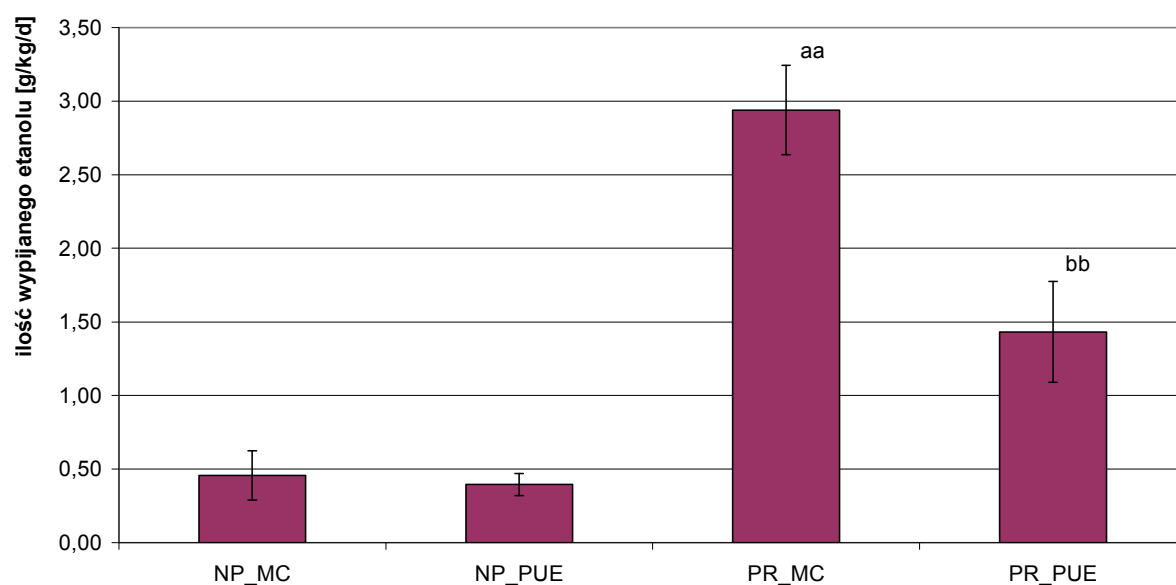
Przeprowadzone doświadczenie nie wpłynęło znamienne na kondycję zwierząt (Tab. 15.), bowiem nie stwierdzono istotnej zmienności w masach zwierząt (ANOVA: $F(3, 40) = 0,69$; $p = 0,5589$) oraz nie zaobserwowano różnic w ilości wypijanych przez nie płynów (ANOVA: $F(3, 40) = 1,11$; $p = 0,3573$).



Ryc. 44. Poziom greliny aktywnej i całkowitej w surowicy u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu pueraryny (150 mg/kg m.c. p.o.).

n=9-12; średnia±SEM; aa – względem odpowiedniej grupy NP_MC, $p < 0,001$;

bb - względem odpowiedniej grupy PR_MC, $p < 0,001$



Ryc. 45. Ilość wypitego etanolu/kg m.c. masy ciała u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu pueraryny (150 mg/kg m.c. p.o.).

n=9-12; średnia±SEM; aa - względem NP_MC, $p<0,001$; bb - względem PR_MC, $p<0,001$

Tab. 15. Zmiany masy ciała oraz suma wypijanych płynów przez szczury NP i PR po wielokrotnym podawaniu pueraryny.

Grupa	n	Masa [g]	Suma płynów [ml/kg m.c./dobę]
NP_MC	12	550,4±23,4	90,4±5,3
NP_PUE	11	530,9±14,9	82,3±3,2
PR_MC	11	546,4±10,9	84,6±5,3
PR_PUE	10	520,0±11,9	94,3±5,8

średnia±SEM

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Przeprowadzenie doświadczeń w tej pracy opierało się na założeniu, że zostaną w nich wykorzystane modele zwiększonego picia alkoholu z wolnego wyboru zarówno uzyskane u zwierząt szczepu Wistar przy użyciu zmodyfikowanego przez nas modelu indukcyjnego, jak i u zwierząt pochodzących z linii o uwarunkowanym genetycznie picciu, wyizolowanych za pomocą selekcji pod tym kątem z kolejnych pokoleń zwierząt. Wprowadzenie procedury wolnego wyboru, a przede wszystkim indukcji i zespołu odstawienia trwającego 14 dni, wpłynęło na pojawienie się wyraźnego odruchu preferencji oraz doprowadziło do wyłonienia dwóch skrajnych grup pod względem preferencji etanolu – szczurów niepreferujących (NP) i preferujących (PR) picie alkoholu z wolnego wyboru, o istotnie zaznaczonych różnicach w ilościach wypijanego etanolu. Jest to zgodne z wnioskami innych autorów, którzy podkreślali, iż zastosowanie takiej procedury, a zwłaszcza interwału 14-dniowego odstawienia pozwala uzyskać szczury NP i PR [Koob 2000, Samson 2000, Spanagel i Kiefer 2008].

Zastosowany w doświadczeniach okres odstawienia (2 przerwy, w czasie których szczury piją tylko wodę), naśladuje wg niektórych opinii „ludzki” schemat picia alkoholu, jednocześnie zwiększając odsetek zwierząt preferujących, pijących znaczne ilości alkoholu [Heyser i wsp. 1997, Spanagel 2003].

W modelu tym udało się wyłonić około 20% zwierząt pijących duże ilości etanolu z wolnego wyboru oraz 20% o niskiej preferencji. Pozostaje to w zgodzie z licznymi pracami w których stwierdzono, iż szczury raczej niechętnie uzależniają się od alkoholu [Mikołajczak i wsp. 2000, Spanagel 2003, McGregor i Gallate 2004]. Z kolei w grupie zwierząt pochodzących z linii (z preferencją uwarunkowaną selekcją) - odmiennie jak w poprzednim modelu, zwierzęta WHP w przeważającej mierze należały do preferujących etanol - dokonywano pomiarów kontrolnych, które potwierdziły duże ilości wypijanego etanolu przez te zwierzęta. W grupie zwierząt WLP natomiast, potwierdzono pomiarami niewielką preferencję etanolu. Dodatkowo zaobserwowano wyraźne zmiany zachowania szczurów w okresie odstawienia, zwłaszcza w grupie WHP, takie jak piloerekcja, sztywność mięśniowa, nadwrażliwość na światło i dźwięki oraz agresja. Pozostaje to w zgodzie z obserwacjami autorów linii [Dyr i wsp. 1999] i wskazuje na możliwość powstania zespołu abstynencyjnego. Tak więc, wyraźnie zaobserwowane zmiany w zachowaniu zwierząt mogą stanowić dowód pośredni, że szczury te można uznać za zwierzęta uzależnione [Dyr i wsp. 1999]. Zastosowanie w niniejszej pracy zwierząt WHP i WLP jako modelu alkoholizmu

doświadczanego jest zgodne z kryteriami charakteryzującymi zwierzęta używane w badaniach eksperymentalnych nad uzależnieniem alkoholowym, a do których należy m.in. rozwijanie linii zwierząt z utrwalonym odruchem samopodawania i wybierania alkoholu (preferencja) spośród innych roztworów [Hammoumi i wsp. 1997, Koob 2000, Sanchis-Segura i Spanagel 2006].

Wiadomo, że poziomy greliny korelują również z masą ciała i spadają wraz z jej wzrostem [Tschop i wsp. 2001b, Bellone i wsp. 2002, Cummings i wsp. 2002b, Shiiya i wsp. 2002]. Dlatego, podczas każdego badania kontrolowano masy ciała zwierząt we wszystkich fazach doświadczenia, co jest ważne dla otrzymania wiarygodnych wyników, na jednolitej pod względem kondycji grupie zwierząt. Stwierdzono, że przebieg doświadczeń i stosowane procedury nie wpłynęły na kondycję zwierząt, ponieważ nie stwierdzono istotnych różnic w masach ciała zwierząt między grupami. Ponieważ w licznych badaniach stwierdzono silną korelację pomiędzy apetytem, spożywanymi posiłkami i głodem, a poziomem greliny we krwi [Cummings i wsp. 2001, Toshinai i wsp. 2001, Suzuki i wsp. 2009], stąd w celu normalizacji poziomu greliny pomiędzy różnymi osobnikami (tj. wykluczenia wpływu ww. czynników) szczury były głodzone 12 godzin przed pobieraniem krwi.

Podczas doświadczeń z piciem alkoholu, mierzono również ilość wypijanych płynów, tak systematycznie w trakcie trwania badań (dane niezamieszczone), jak i na końcu każdego doświadczenia. W przebiegu wszystkich doświadczeń nie stwierdzono istotnych różnic między grupami w sumarycznej ilości wypijanych płynów, co świadczyłoby, że stosowana w doświadczeniach procedura nie wpłynęła na stan gospodarki wodnej szczurów, a tym samym, że zwierzęta nie były odwodnione. Taki stan pozostaje w zgodzie z danymi uzyskiwanymi w innych badaniach przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Farmakologii UM w Poznaniu w podobnym układzie doświadczalnym [Mikołajczak i wsp. 2003], czy też postulowanymi przez innych autorów [Lin i wsp. 1996].

Badania Gomeza i wsp. wykazały, że picie wody nie wpływa na poziomy greliny [Gomez i wsp. 2004], stąd, w zastosowanym modelu zwierzęta miały swobodny dostęp do wody do końca doświadczeń. Na podstawie wyników własnych również nie zaobserwowano korelacji pomiędzy ilością wypijanej wody (u zwierząt kontrolnych) a poziomami greliny.

Wykluczenie z badań zmiennych takich jak swobodny i różny dostęp do paszy przed pobieraniem krwi, różna masa ciała zwierząt, godzina pobrania, lub brak znaczenia takich zmiennych jak wpływ picia wody, umożliwił przeprowadzenie badań w sposób maksymalnie zoptymalizowany i pozbawiony wpływu czynników zewnętrznych, innych niż alkohol i/lub

stosowane leki. Realizacja tych założeń pozwoliła zmniejszyć ryzyko powstania błędów i rozbieżności w otrzymanych wynikach.

W badaniach nad działaniem leków u zwierząt pijących alkohol zastosowano między innymi akamprozat (AC) w dawce 500 mg/kg m.c. p.o., podobnie jak w poprzednich badaniach przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Farmakologii UM [Okulicz-Kozaryn i wsp. 2001, Mikołajczak i wsp. 2002, Pioruńska-Mikołajczak i wsp. 2004]. AC jest lekiem o uznanym działaniu przeciwalkoholowym [Whitworth 1996, Mason i wsp. 2003, 2006, Mann i wsp. 2009, Diehl i wsp. 2010], chociaż dokładny mechanizm jego działania pozostaje ciągle przedmiotem badań [Mann i wsp. 2008].

Zaobserwowany efekt badanego leku to zmniejszenie picia alkoholu z wolnego wyboru o ok. 30% przez zwierzęta PR i WHP w stosunku do odpowiednich zwierząt kontrolnych, nieotrzymujących leku. Tym samym potwierdzono skuteczność AC w warunkach modelowych, co pozostaje w zgodności z innymi badaniami [Gewiss i wsp. 1991, Szulc i wsp. 2002, Pioruńska-Mikołajczak i wsp. 2004].

W kolejnych badaniach podawano wielokrotnie (28x) naltrekson (NAL) w dawce 0,1 mg/kg m.c. i.p. szczurom NP i PR, podobnie jak w poprzednich badaniach [Okulicz-Kozaryn i wsp. 2004]. Badano wpływ tego leku na odruch picia i zaobserwowano, że w grupie zwierząt PR ilość wypijanego etanolu spadła trzykrotnie względem grupy otrzymującej placebo, co pozostaje w zgodzie z innymi badaniami i obserwacjami u ludzi [Williams i Woods 1999, Heinälä i wsp. 2001, Sinclair 2001].

W kolejnym badaniu podawano ekstrakt z korzenia ołownika łatkowatego – kudzu (KU) w dawce 500 mg/kg m.c. p.o. przez 28 dni według danych z innych badań [Mikołajczak i wsp. 2006]. Zastosowanie KU jako substancji pochodzenia roślinnego było poparte opisami na temat jego działania i wykorzystania w medycynie tradycyjnej oraz nowszymi badaniami [Wing i Vallee 1998, Keung 2003, Mikołajczak i wsp. 2009].

Wyniki picia alkoholu z wolnego wyboru przez zwierzęta otrzymujące KU wykazały, wyraźne zmiany, wyrażone 6-krotnym zmniejszeniem ilości wypijanego alkoholu przez zwierzęta należące do grupy PR w porównaniu do zwierząt otrzymujących vehiculum. Jest to dowód na to, że w przedstawionym modelu doświadczalnym KU wykazywało działanie zmniejszające picie etanolu z wolnego wyboru. Było to zgodne z wynikami badań innych autorów, w których KU miał zdolność do hamowania odruchu picia przez zwierzęta doświadczalne [Keung i wsp. 1995, Overstreet i wsp. 1996, Keung i Valle 1998, Overstreet i wsp. 1998, Keung 2003].

Wiadomo, że KU jako surowiec pochodzenia roślinnego, stosowany w niniejszych badaniach jako ekstrakt, ze swej natury stanowi mieszaninę różnych związków chemicznych. Za związki decydujące o przeciwalkoholowej aktywności farmakologicznej KU uznaje się przede wszystkim izoflawonoidy. Znając skład ekstraktu (rozdział 3.1.1) postanowiono sprawdzić, czy efekty zaobserwowane po podaniu samego KU na picie alkoholu z wolnego wyboru będą podobne dla działania wyizolowanych związków – daidzyny (DAI) i pueraryny (PUE).

Do badań wpływu DAI na odruch picia alkoholu zastosowano dawkę 40 mg/kg m.c. p.o., podobnie jak we wcześniejszych badaniach [Mikołajczak i wsp. 2009]. Ponieważ wiadomo, że zawartość DAI w KU (tj. ekstrakcie z korzenia *Pueraria lobata*) wynosi 6,91% (Rozdział 3.1.1) a silny efekt antyalkoholowy (tak w poprzednich badaniach prowadzonych w Katedrze jak i prezentowanych w niniejszej pracy) obserwowano po zastosowaniu dawki KU 500 mg/kg m.c., p.o., stąd postanowiono przeprowadzić dalsze badania wykorzystując DAI w dawce 40 mg/kg m.c. p.o., co proporcjonalnie odpowiada przybliżonej zawartości tego izoflawonoidu w 500 mg/kg m.c. KU. Na podstawie otrzymanych wyników, stwierdzono, że wielokrotne (28x) podawanie DAI (40 mg/kg m.c. p.o.) wpłynęło na zmniejszenie ilości wypijanego alkoholu o około 20% przez zwierzęta należące do grupy PR, co sugeruje, że DAI posiada działanie hamujące picie etanolu z wolnego wyboru. Należy jednak zaznaczyć, że czynnikiem ograniczającym aktywne działanie DAI jest jej biodostępność przy podaniu dożołądkowym. Wiadomo bowiem, jak sugerują niektórzy autorzy, iż DAI podana w ten sam sposób co KU, wywołuje efekty antyalkoholowe 10 razy słabsze niż po podaniu tej samej ilości tego izoflawonoidu ale zawartego w KU [Keung i wsp. 1996, Keung 2003]. Różnice te mogą mieć znaczenie zarówno w działaniu obwodowym jak i ośrodkowym DAI. Ponadto w niektórych pracach podawano DAI (30 mg/kg m.c., p.o.) w peletkach razem z dietą, stąd procedura ta mogłaby zwiększać biodostępność zawartego w nich izoflawonoidu [Lin i wsp. 1996]. Niemniej, znane są też sugestie o braku wpływu diety na działanie DAI jako substancji zmniejszającej picie etanolu przez zwierzęta doświadczalne [Heyman i wsp. 1996].

Drugim izoflawonoidem, którego wpływ na picie etanolu z wolnego wyboru zbadano, była PUE. Dawka tego związku (150 mg/kg m.c., p.o.) została wybrana na podstawie danych z piśmiennictwa [Lin i wsp. 1996, Overstreet i wsp. 1996] oraz na podstawie dawki KU (500 mg/kg m.c., p.o.) stosowanego uprzednio do badań w Katedrze, uwzględniając typowy skład procentowy izoflawonoidów w korzeniu tego surowca [Matkowski i wsp. 2003] jak i w ekstrakcie (Rozdział 3.1.1).

Związek ten podawano przez 28 dni, według tego samego schematu jak pozostałe substancje użyte w doświadczeniach. Z otrzymanych danych wynika, że wielokrotne podawanie PUE wywołało zmianę wyrażoną spadkiem ilości wypijanego alkoholu o połowę przez zwierzęta należące do grupy PR, co jest zgodne z wynikami innych autorów [Lin i wsp. 1996, Overstreet i wsp. 1996].

Analiza wyników badań z wykorzystaniem KU, DAI i PUE jako potencjalnych związków o działaniu zmniejszającym picie pokazała, że najsilniejszy efekt wywiera KU obniżając picie etanolu 6-krotnie, natomiast DAI i PUE wykazują taki efekt tylko w 20% i 50%. Taka obserwacja może sugerować, że za działanie zmniejszające picie odpowiadają nie tylko zawarte w KU aktywne izoflawonoidy, co wcześniej zostało udowodnione [Lin i wsp. 1996, Overstreet i wsp. 1996], ale również inne substancje zawarte w wyciągu, które mogą m.in. ułatwiać wchłanianie DAI i PUE jako związków aktywnych, bądź wpływać na właściwości w ekstrakcie poprzez inne mechanizmy.

W przeprowadzonych badaniach postanowiono również sprawdzić, jakie poziomy etanolu we krwi będą obserwowane po jego jednorazowym podaniu. Zgodnie z oczekiwaniami, stwierdzono występowanie dawkozależnej i wprost proporcjonalnej zależności pomiędzy ilością podanego etanolu i.p., a jego poziomem obserwowanym we krwi. Na uwagę zasługuje fakt, że w grupie zwierząt pochodzących z linii, podanie etanolu w najwyższej dawce (4,0 g/kg m.c.) powoduje istotnie niższe stężenia u zwierząt WHP niż w grupie WLP. Obserwacja ta pozostaje w zgodzie z obserwacjami autorów linii, którzy stwierdzili, że w doświadczeniu z jednorazowym podaniem etanolu w dawce 2,0 g/kg m.c. zwierzęta WHP mają niższe stężenia etanolu we krwi od zwierząt WLP [Dyr i wsp. 1999]. W innym badaniu, ci sami autorzy zaobserwowali, że zwierzęta o wysokiej preferencji picia mimo wypijania wielokrotnie większych ilości etanolu w stosunku do zwierząt niepreferujących posiadają porównywalne stężenia etanolu we krwi, co nasunęło przypuszczenie, że zwierzęta te znacznie szybciej metabolizują alkohol oraz lepiej znoszą jego wysokie dawki [Dyr i wsp. 1999].

W badaniu nad rozwojem tolerancji etanolowej u zwierząt WHP stwierdzono, że codzienne, dootrzewnowe podawanie etanolu prowadzi do szybkiego rozwoju tolerancji u tych zwierząt, a efekt ten można stwierdzić już w trzeciej dobie doświadczenia. Jest to w zgodzie z podobnymi badaniami wykonanymi na zwierzętach szczepu Wistar w Katedrze i Zakładzie Farmakologii [Okulicz i wsp. 1992].

Obserwacje dotyczące poziomów fizjologicznych greliny (u szczurów pozbawionych dostępu do alkoholu) pokazały, że szczury pochodzące z linii (WHP) wykazują fizjologiczną

odmienność w stosunku do szczurów Wistar. Wykorzystanie w badaniach modelu z preferencją uwarunkowaną selekcją (WHP i WLP) dało tę przewagę, że możliwa była ocena poziomów greliny bez ekspozycji zwierząt na alkohol, dzięki czemu udało się określić poziomy „fizjologiczne” greliny w tej grupie zwierząt. Stwierdzono, że u szczurów WLP stężenia tak greliny aktywnej, jak i całkowitej są na poziomie zbliżonym do szczurów Wistar. Zaobserwowano natomiast, że u zwierząt WHP poziom tak greliny aktywnej jak i całkowitej jest obniżony o około 40% w stosunku do wartości w pozostałych grupach.

Ograniczona liczba badań nad linią WLP i WHP nie daje możliwości potwierdzenia takiej obserwacji oraz wytłumaczenia jej w tym względzie. Należy jednak podkreślić, iż w badaniach przeprowadzonych wcześniej w Katedrze zauważono również różnice pomiędzy szczurami WHP i WLP wyrażone stężeniami leptyny [Mikołajczak i wsp. 2002]. Stwierdzono bowiem, że u zwierząt WLP nie pijących etanolu poziom leptyny tak w surowicy jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym były znamienne niższe niż u zwierząt WHP nie otrzymujących alkoholu.

Reasumując, z badań przeprowadzonych w niniejszej pracy oraz danych z cytowanych badań wynika, że wyjściowo szczury WHP mają wyższe poziomy leptyny, a niższe greliny w porównaniu do ich odpowiedników niepreferujących, tj, szczurów WLP.

Różnice stężeń peptydów endogennych zaobserwowano również w innych badaniach, w których stwierdzono, że poziom β -endorfin we krwi jest wyjściowo niższy u WHP w porównaniu do WLP [Zalewska-Kaszubska i wsp. 2005].

W niniejszych badaniach zaobserwowano znamienne niższe stężenia etanolu we krwi szczurów WHP w stosunku do WLP po jednorazowym podaniu alkoholu, które mogą być tłumaczone różnicami metabolizmu tych zwierząt [Dyr i wsp. 1999]. Te obserwacje pozwalają przypuszczać, że zwierzęta te różnią się nie tylko ilością wypijanego alkoholu, ale wykazują również szereg zmian i różnic na poziomie neurologicznym i biochemicznym, co postulują ci sami autorzy [Dyr i Kostowski 2008].

W badaniu po jednorazowym, dootrzewnowym podaniu alkoholu stwierdzono generalną tendencję do obniżania poziomów greliny przez alkohol w sposób odwrotnie proporcjonalny do dawki u szczurów Wistar i WLP, co pozostaje w zgodzie z efektami po podawaniu wielokrotnym oraz obserwacjami u ludzi, u których jednorazowe podanie alkoholu zdrowym ochotnikom powodowało spadek poziomu greliny całkowitej [Calissendorf i wsp. 2005, 2006, Zimmermann i wsp. 2007]. Efekt ten u ludzi pojawia się po kilku minutach osiągając minimum po 75 minutach i trwa kilka godzin wg cytowanych

autorów. Spadek stężenia greliny spowodowany podaniem alkoholu nie odpowiada jego wartości kalorycznej, więc nie może być tłumaczony tym faktem [Zimmermann i wsp. 2007].

Odmienne działanie alkoholu zaobserwowano natomiast u zwierząt WHP, u których wystąpił dawkozależny i wprost proporcjonalny wzrost poziomów obu form greliny w odpowiedzi na jednorazowe podanie różnych dawek alkoholu. Jak wspomniano wcześniej, u zwierząt WHP zaobserwowano również fizjologicznie niższe stężenia greliny w stosunku do zwierząt WLP i Wistar. Obecny stan wiedzy nie pozwala jednak na jasną odpowiedź, co może leżeć u podstaw takiej odmienności.

Zastosowane modele, tj. zarówno model indukcyjny (szczury PR i NP) jak i model z wykorzystaniem zwierząt pochodzących z linii (WHP i WLP) dały podobny obraz zmian wyrażonych zmierzonymi stężeniami greliny. Wydaje się, że już kilkudniowe działanie alkoholu wyraźnie obniża poziomy obu form greliny, co stwierdzono w doświadczeniu związanym z wywoływaniem tolerancji etanolowej. Ponadto, długotrwałe picie alkoholu przez szczury wywołuje podobne efekty.

W jednym z pierwszych badań wszystkim grupom zwierząt pobrano krew przed rozpoczęciem doświadczenia, jak i po okresie preferencji (Ryc. 30, Ryc. 31). Pomiar poziomów greliny wykazał, że początkowo wszystkie szczury, z których później wyłoniono grupy NP i RP stanowiły homogeną, niezróżnicowaną ze względu na stężenia obu form greliny jak i preferencji do picia alkoholu z wolnego wyboru grupę. Po okresie preferencji (patrz rozdział 3.1.4) stwierdzono natomiast zróżnicowanie zwierząt zarówno pod względem ilości picia etanolu na NP i PR oraz proporcjonalnie do tego wyboru zróżnicowanie poziomów obu form greliny. Zauważono, że szczury PR miały niższe stężenia greliny od szczurów NP. Podobne efekty zaobserwowano również w innych doświadczeniach - generalnie szczury PR i WHP mają niższe stężenia obu form greliny niż szczury NP i WLP - co więcej jest to odwrotnie proporcjonalnie skorelowane z ilością wypijanego alkoholu przez szczury PR i WHP. Na podstawie otrzymanych danych, można również zaryzykować stwierdzenie, że oba modele można w ten sam sposób scharakteryzować przy pomocy stężeń greliny, a otrzymane różnice wynikają wyraźnie z większej ilości alkoholu wypijanego przez szczury WHP w stosunku do PR. Wyjaśnienie przyczyny tej zależności nie jest łatwe, chociaż podobne obserwacje stwierdzono w niektórych badaniach u alkoholików, którzy mieli istotnie niższe stężenia greliny niż zdrowi ochotnicy [Addolorado i wsp. 2006]. Podobnie w badaniach Badaoui stwierdzono, że poziom aktywnej greliny u osób pijących alkohol jest obniżony [Badaoui i wsp. 2008].

Przyczyna wpływu długotrwałego picia alkoholu na obniżenie stężenia greliny nie jest znana. Ten fakt zastanawia tym bardziej, że u szczurów WHP w przeprowadzonych doświadczeniach zaobserwowano odwrotnie, wprost proporcjonalnie i dawko zależny efekt po podaniu jednorazowym etanolu, czyli wzrost poziomów obu form greliny w odpowiedzi na alkohol podany i.p. Być może obserwowana jest tutaj znana zasada istniejąca w farmakologii doświadczalnej, że efekty jednorazowego podania etanolu często różnią się znacząco co do kierunku zmian w stosunku do podań przewlekłych [Kostowski i Herman 2003]. Do tego wyjaśnienia należy jednak podejść z ostrożnością, bowiem efekty alkoholu u szczurów typu WLP i NP nie mogą być tłumaczone w ten sam sposób.

Wcześniejsze badania nad KU wykazały jego działanie obniżające picie etanolu, w związku z czym postanowiono sprawdzić jego możliwy wpływ na rozwój tolerancji. Dysponując sprawdzonym modelem tolerancji [Okulicz i wsp. 1992], przeprowadzono badanie, które wykazało, że KU hamuje rozwój tolerancji etanolowej, co najsilniej zaobserwowano po 60 minutach od podania etanolu. Otrzymane wyniki działania KU są interesujące, zwłaszcza, że jak wiadomo tolerancja jest procesem, który często poprzedza lub towarzyszy rozwojowi procesu uzależnienia od alkoholu wg DSM IV [Soyka i wsp. 2008, Schuckit 2009].

Oceniono również stężenie greliny po przeprowadzeniu doświadczeń nad rozwojem tolerancji alkoholowej i wykazano, że już 8-krotne podawanie etanolu powoduje silny spadek wartości obu form greliny. Stwierdzono również, że już ośmiokrotne podanie KU – analogicznie jak w przypadku podawania długotrwałego (28x) - powoduje nasilenie spadku poziomu greliny w stosunku do grupy otrzymującej sam etanol. Obserwacja w grupie otrzymującej tylko KU wykazała natomiast brak spadku poziomu greliny w tej grupie, co może sugerować, że za spadek wartości greliny nie odpowiada efekt kaloryczny ekstraktu ani jego związki aktywne jak DAI i PUE (które powodowały wzrost stężenia obu form tego peptydu – rozdziały 4.10 i 4.11) lecz pewien rodzaj interakcji pomiędzy etanolem, a KU.

Analiza wpływu wielokrotnego (28x) podania AC na poziomy greliny u zwierząt NP i PR oraz WLP i WHP wykazała, że w obu układach doświadczalnych poziom greliny tak aktywnej jak i całkowitej ulegał istotnemu obniżeniu na skutek picia alkoholu, a podawanie AC działało wyrównująco na ten proces podnosząc poziom greliny do wartości obserwowanych u zwierząt kontrolnych (NP lub WLP). Mechanizm, na podstawie którego badany lek miałby wpływać na zmiany poziomu greliny nie jest znany. Wiadomo, że blokowanie receptora NMDA w układzie mezo limbicznym (VTA) prowadzi do zahamowania

wzrostu aktywności motorycznej obserwowanej po podaniu greliny [Jerlhag i wsp. 2011]. Jednakże nie jest jasne, na ile ten mechanizm jest związany z wpływem AC na poziom obu form greliny obserwowanym w tej pracy. Wiadomo, że AC wpływa też na stężenie leptyny (peptydu fizjologicznie działającego przeciwstawnie do greliny) w płynie mózgowo-rdzeniowym u zwierząt preferujących [Mikołajczak i wsp. 2004]. Odpowiedź na pytanie, czy wpływ AC na poziom greliny jest powiązany ze wzrostem stężenia leptyny, wymaga dalszych badań.

Zaobserwowane zmiany poziomów greliny pozostawały w jednoznacznie odwrotnie proporcjonalnej zależności z ilością wypijanego alkoholu przez zwierzęta PR i WHP. Choć dokładny mechanizm tej zależności nie jest jasny, wydaje się, że jest on spowodowany głównie ilością dostępnego alkoholu spożywanego przez szczury PR i WHP. Znany jest, co prawda fakt, że AC może obniżać ekspresję genu dla greliny u myszy w korze frontalnej [Hicks i Olive 2009], jednak badania te przeprowadzono bez udziału alkoholu, stąd wnioski z nich wypływające nie mogą w prosty sposób odnosić się do badań przeprowadzonych w niniejszej pracy.

W przebiegu badania nad wpływem NAL na odruch picia alkoholu z wolnego wyboru u szczurów NP i PR stwierdzono, że NAL wpływa normalizująco na obniżone wartości obu form greliny u szczurów PR, czego nie zaobserwowano u zwierząt NP. Efekt ten podobnie jak dla podawania AC pozostaje w odwrotnie proporcjonalnym związku z ilością wypijanego alkoholu w warunkach jego wyboru przez zwierzęta PR. Natura wpływu NAL na wzrost poziomu greliny przy jednoczesnym zniesieniu picia alkoholu jest prawdopodobnie związana z działaniem samego alkoholu, chociaż nie można wykluczyć bardziej skomplikowanych mechanizmów związanych z działaniem przez receptor dla greliny na aktywność POMC i CART - peptydów zaangażowanych w powstawanie uzależnień [Zigman i Elmquist 2003]. Podobnie, nie można wykluczyć, iż blokowanie receptorów opioidowych prowadzi do działania zmniejszającego aktywność β -endorfin u szczurów RP, u których podanie alkoholu powoduje znamienne wyższe uwalnianie β -endorfin w porównaniu ze zwierzętami NP [Zalewska-Kaszubska i wsp. 2005]. Badania na szczurach pochodzących z linii (WLP i WHP) wykazały bowiem, że poziom β -endorfin jest wyjściowo niższy u WHP, ale po podaniu alkoholu wzrasta silniej u WHP niż u WLP [Zalewska-Kaszubska i wsp. 2005].

W kolejnym badaniu zwierzętom po okresie preferencji podawano długotrwale (28x) KU. Stwierdzono, że odmiennie do pozostałych substancji KU nie powoduje wyrównania poziomów greliny do wartości kontrolnych, lecz dalszy spadek jej wartości. Można by sądzić, że jest to efekt, na który wpływ może mieć wartość kaloryczna ekstraktu, ponieważ nie

stanowił on czystej, aktywnej substancji chemicznej, lecz alkoholowy wyciąg roślinny w skład którego wchodziły tłuszcze, białka i węglowodany, których podanie wywołuje obniżenie poziomu greliny [Gomez i wsp. 2004]. Mechanizm ten jednak w przedstawionych badaniach nie występuje, bowiem jak już wspomniano poprzednio, w części doświadczeń w których badano wpływ KU na rozwój tolerancji etanolowej, połączenie KU tylko z wodą nie wpływało na stężenie obu form greliny. Stąd wydaje się, że przyczyną obniżenia stężeń greliny po podaniu KU w obecności alkoholu etylowego jest bliżej niezany mechanizm interakcji związków obecnych w stosowanym wyciągu z korzenia *Pueraria lobata* z etanolem.

W kolejnych badaniach sprawdzano również wpływ izoflawonoidów obecnych w KU, a mianowicie DAI i PUE na stężenia greliny. Zaobserwowano – podobnie jak po podawaniu AC i NAL - działanie wyrównujące poziomy greliny u zwierząt PR otrzymujących omawiane substancje. W przypadku DAI stwierdzono, że związek ten normalizował stężenia obu form greliny w stosunku do stężeń obserwowanych dla zwierząt NP stanowiących kontrolę, natomiast DAI nie zmieniała stężeń badanego peptydu u szczurów NP. Z kolei analizując wpływ PUE na stężenie tak greliny aktywnej jak i całkowitej zauważono, że badany izoflawonoid normalizował stężenie formy całkowitej greliny do wartości kontrolnych u szczurów NP. W przypadku analizowania wpływu PUE na poziomy greliny aktywnej omawiany izoflawonoid jednoznacznie podwyższał jej stężenie, jednakże do wartości obserwowanych u szczurów NP otrzymujących PUE. Były to poziomy nieco wyższe niż obserwowane u zwierząt stanowiących kontrolę dla NP (choć nieznamienne podczas porównywania NP_PUE vs NP_MC). Mechanizm, na podstawie którego oba izoflawonoidy miałyby wpływać na zmiany poziomu greliny nie jest znany, jest on jednak wyraźnie skorelowany z jednoznacznym zmniejszeniem ilości wypijanego alkoholu przez szczury PR.

Podsumowując, na podstawie przeprowadzonych badań zauważono silny, odwrotnie proporcjonalny związek pomiędzy ilością podawanego alkoholu, stężeniem etanolu we krwi, a poziomem greliny aktywnej i całkowitej u zwierząt doświadczalnych. Można więc postulować, że obniżone poziomy obu form greliny mogą stanowić pewien sygnał (wskaźnik) dłuższego picia alkoholu. Jednakże, ze względu na fakt, że szczury WHP wykazują wyjściowo niższe stężenia obu form greliny oraz odmienną wprost proporcjonalną dawkozależną reakcję na jednorazowe podanie etanolu w stosunku do szczurów WLP i Wistar, stąd wydaje się, że u tej specyficznej grupy, zwłaszcza na początku kontaktu z alkoholem odpowiedź wyrażona za pomocą greliny jest inna, być może stanowiąc pewien

marker predyspozycji do picia alkoholu, zwłaszcza w połączeniu z pomiarami stężeń leptyny we krwi.

Zauważono także jednoznaczną, proporcjonalną zależność pomiędzy działaniem przeciwalkoholowym (zmniejszającym odruch picia alkoholu) leków (AC i NAL) i izoflawonoidów (DAI i PUE), a normalizacją poziomów obu form greliny, czego nie obserwowano dla działania KU (efekt obniżający). Można więc sądzić, że stężenia obu form greliny mogłyby pełnić pewną rolę wskaźnikową, zwłaszcza podczas kontrolowania ilości wypijanego alkoholu jak i aktywności przeciwalkoholowej czy skuteczności działania stosowanych obecnie leków.

Zastosowanie jednak greliny do badania zależności między ilością wypijanego alkoholu i/lub skutecznością działania przeciwalkoholowego musi być traktowane z ostrożnością, bowiem na przykład podawanie KU skutkuje uzyskaniem odmiennych efektów.

Na podkreślenie zasługuje jednak fakt, że wyciąg ten wykazał interesującą zdolność hamowania rozwoju tolerancji etanolowej u szczurów typu WHP, co mogłoby wskazywać, że KU mogłoby znaleźć zastosowania nie tylko w celu zmniejszenia ilości wypijanego alkoholu, ale również poprzez hamowanie rozwoju tolerancji, zmniejszać ryzyko powstania zależności alkoholowej.

6. WNIOSKI

1. Istnieje silny, odwrotnie proporcjonalny związek pomiędzy ilością podawanego alkoholu, stężeniem etanolu we krwi, a poziomem greliny aktywnej i całkowitej u zwierząt doświadczalnych, z wyjątkiem szczurów WHP.
2. Szczury WHP wykazują wyjściowo niższe stężenia obu form greliny oraz wprost proporcjonalną i dawkozależną, reakcję na jednorazowe podanie etanolu w stosunku do szczurów WLP i zwierząt kontrolnych.
3. Szczury preferujące (PR i WHP), pijące alkohol posiadają niskie stężenia obu form greliny skorelowane odwrotnie proporcjonalnie z ilością wypijanego alkoholu.
4. Istnieje proporcjonalna zależność pomiędzy działaniem przeciwalkoholowym (zmniejszającym odruch picia alkoholu) leków (akamprozat i naltrekson) i izoflawonoidów (daidzyna i pueraryna), a normalizacją poziomów obu form greliny.
5. Wyciąg z korzenia *Pueraria lobata* zmniejsza ilość wypijanego alkoholu jednocześnie obniżając stężenia obu form greliny – odmiennie, niż pozostałe badane substancje.
6. Wyciąg z korzenia *Pueraria lobata* zapobiega rozwojowi tolerancji etanolowej u szczurów WHP.
7. Wydaje się, że stężenia greliny w surowicy krwi mogłyby być wskaźnikiem nadmiernego picia alkoholu i/lub skuteczności działania stosowanych obecnie leków przeciwalkoholowych.

7. STRESZCZENIE

Istnieją dane skłaniające do hipotezy, że grelina mogłaby uczestniczyć w ośrodkowym działaniu alkoholu, jak i ewentualnie stanowić obwodowy wskaźnik zmian towarzyszących długotrwałemu picciu alkoholu [Calissendorff i wsp. 2005]. Wiadomo, że istnieje związek między działaniem niektórych leków antypsychotycznych czy środków o działaniu stymulującym, a stężeniami greliny we krwi obwodowej [Palik i wsp. 2005, Murashita i wsp. 2007], stąd w niniejszej pracy postanowiono określić udział greliny w aktywności leków przeciwalkoholowych w modelu doświadczalnym uzależnienia alkoholowego.

W tym celu zaplanowano określenie związku pomiędzy stężeniem alkoholu, a stężeniem greliny po podaniu jednorazowym alkoholu jak i podczas długotrwałego picia alkoholu przez zwierzęta doświadczalne; poszukiwanie odpowiedzi na pytanie czy grelina może być wskaźnikiem różnicującym preferencję do picia alkoholu, pomiędzy heterozygotycznymi szczurami (środowiskowy model indukcyjny), a szczurami pochodzącymi z tzw. linii (model genetyczny) oraz znalezienie związku pomiędzy działaniem przeciwalkoholowym wybranych środków, a stężeniem greliny w surowicy u szczurów poddanych długotrwałemu działaniu alkoholu z zastosowaniem leków (akamprozat, naltrekson), środków o spodziewanym działaniu przeciwalkoholowym pochodzenia roślinnego - wyciągu z korzenia ołownika łąkowego (*Pueraria lobata*, Willd Ohwi) i jego głównych izoflawonoidów (pueraryna, daidzyna).

Badania przeprowadzono na szczurach, samcach szczepu Wistar, preferujących picie alkoholu z wolnego wyboru (PR) oraz niepreferujących (NP) otrzymanych po zastosowaniu modelu indukcyjnego oraz na szczurach preferujących pochodzących z tzw. linii - Warsaw High Preferring (WHP) oraz niepreferujących – Warsaw Low Preferring (WLP). Zastosowane środki tj. akamprozat (500 mg/kg m.c., p.o.), naltrekson (0,1 mg/kg m.c., i.p.), wyciąg z korzenia *Pueraria lobata* – kudzu (500 mg/kg m.c., p.o), daidzynę (40 mg/kg m.c., p.o.) oraz puerarynę (150 mg/kg m.c., p.o) podawano raz dziennie przez okres 28 dni. Następnie zwierzęta dekapitowano i w otrzymanej surowicy z krwi obwodowej zmierzono stężenie greliny całkowitej i aktywnej przy pomocy metody ELISA.

Stwierdzono, że szczury WHP niepoddane działaniu alkoholu posiadają niższe stężenia greliny aktywnej i całkowitej w surowicy w porównaniu do zwierząt WLP i zwierząt Wistar stanowiących kontrolę. U szczurów, którym podano jednorazowo etanol zaobserwowano wprost proporcjonalną zależność pomiędzy stężeniem alkoholu, a poziomami

greliny aktywnej i całkowitej w surowicy szczurów WHP, a odwrotnie proporcjonalną u szczurów WLP i Wistar. Długotrwałe picie alkoholu przez zwierzęta NP, PR oraz WLP i WHP powoduje spadek poziomu greliny aktywnej w tych grupach szczurów, podczas gdy dla greliny całkowitej efekt ten jest widoczny u zwierząt NP, PR i WHP w porównaniu do szczurów szczepu Wistar – kontrolnych, nie poddanych działaniu alkoholu. Ponadto szczury preferujące typu PR i WHP poddane długotrwałemu działaniu alkoholu posiadają niższe poziomy obu form greliny w stosunku do zwierząt NP i WLP, a otrzymane różnice poziomów obu form greliny u PR i WHP pozostają w odwrotnie proporcjonalnym związku z ilością wypijanego alkoholu. Podawanie akamprozatu i naltreksonu oraz izoflawonoidów (daidzyny i pueraryny) powoduje we wszystkich układach doświadczalnych normalizację stężeń obu form greliny pozostającą w związku z obniżeniem ilości wypijanego alkoholu przez zwierzęta doświadczalne. Wielokrotne (8x) oraz długotrwałe (28x) podawanie wyciągu z korzenia *Pueraria lobata* powoduje obniżenie obu form greliny u szczurów PR, a wielokrotne (8x) stosowanie tego wyciągu zapobiega rozwojowi tolerancji etanolowej u szczurów WHP.

Podsumowując na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że istnieje silny związek pomiędzy ilością wypijanego alkoholu, stężeniem etanolu we krwi, a poziomem greliny aktywnej i całkowitej u zwierząt doświadczalnych, a pomiar greliny we krwi może służyć jako wskaźnik predyspozycji do picia alkoholu. Grelina może także służyć jako ewentualny marker działania przeciwalkoholowego leków zmniejszających odruch picia alkoholu.

8. SUMMARY

THE ROLE OF GHRELIN IN THE EFFICIENCY ASSESSMENT OF ANTIALCOHOLIC COMPOUNDS

There is a hypothesis that ghrelin, which is able to induce appetite, may contribute to the development of alcohol dependence and also act as a peripheral marker through long-term alcohol use [Calissendorff i wsp. 2005]. It is known that ghrelin peripheral blood level can be affected by the activity of some antipsychotic drugs or stimulant agents [Palik i wsp. 2005, Murashita i wsp. 2007], therefore the aim of this study was to assess the contribution of ghrelin in activities of antialcoholic drugs in experimental model of alcoholism.

It was planned to find the relationship between ethanol and ghrelin blood concentration both after acute administration and long term alcohol drinking in experimental animals, answer for the question whether ghrelin could be a marker for the differentiation the preference for alcohol drinking behavior between heterozygotic rats (environmental inducible model) and inbred rat lines for ethanol drinking (genetic model), find the relationship between antialcoholic activities of chosen agents and ghrelin blood levels in rats after chronic alcohol consumption using such antialcoholic drug as acamprosate, naltrexone and extract from root of *Pueraria lobata* - kudzu, and its main isoflavonoids as puerarin and daidzin.

The study was performed using male Wistar alcohol preferring (PR) and nonpreferring (NP) rats (environmental inducible model) and Warsaw High Preferring (WHP) Warsaw Low Preferring (WLP) rats. Acamprosate (500 mg/kg m.c., p.o.), naltrexone (0,1 mg/kg m.c., i.p.), extract from root of *Pueraria lobata* (500 mg/kg m.c., p.o), daidzin (40 mg/kg m.c., p.o.) or puerarin (150 mg/kg m.c., p.o) were administered to rats for 28 consecutive days. Next, after decapitation the acetylated ghrelin (active form) and total ghrelin concentrations in plasma were measured using ELISA method.

It was found that plasma ghrelin concentrations in ethanol-naïve WHP animals showed a significantly lower when compared with the ethanol-naïve WLP or Wistar rats. After acute ethanol administration the simple or inverse relationship between alcohol concentration and both ghrelin levels in plasma of WHP rats or WLP and Wistar animals were found, respectively. Chronic alcohol intake in NP, PR and WLP or WHP animals led to decrease of active ghrelin concentrations, whereas for total ghrelin the effect were found in NP, PR and WHP rats when compared with ethanol-naïve Wistar animals. Moreover, the PR

and WHP rats after chronic alcohol drinking had lower levels of both form of ghrelin in comparison to NP and WHP, respectively, and the observed differences in ghrelin levels were in inverse relationship with their alcohol intake. After acamprosate, naltrexone and daidzin or puerarin administration the increase of active and total ghrelin levels were found in WHP or PR rats which corresponded with their lowering of alcohol consumption. Multiple (8x) and chronic (28x) extract from root of *Pueraria lobata* administration led to decrease of both forms of ghrelin levels in PR animals. Moreover, the multiple kudzu treatment showed the protective activity against development of ethanol tolerance in WHP rats.

Concluding, on basis of the studies it can be assumed that there is a strong relationship between alcohol administration or intake, ethanol concentration in blood and both active and total ghrelin level in the experimental animals, and ghrelin plasma concentration can be a marker of alcohol drinking predisposition. Moreover, ghrelin could be of value as a possible indicator of antialcoholic activities of drugs shown by the lowering of alcohol intake.

9. SPIS RYCIN i TABEL

RYCINY:

Ryc. 1. Receptory dla wydzielania GH oraz różne związki je pobudzające [wg Kojima i Kangawa, 2005].....	19
Ryc. 2. Grelina jest kodowana przez pierwsze dwa eksony. Unikalne jest, że w procesie przetwarzania hnRNA (pre-mRNA) powstają dwie niezależne cząsteczki mRNA, dając początek formom greliny o różnej strukturze [wg Casseneuve i wsp. 2004].	19
Ryc. 3. Kolejne etapy powstawania greliny oraz jej pochodnych [wg Soares i wsp. 2008].....	21
Ryc. 4. Podstawowe formy greliny w organizmie człowieka [wg Castaneda i wsp. 2010].	22
Ryc. 5. Dobowe poziomy greliny. Przerwywaną linią zostały zaznaczone posiłki. Czarne punkty to poziom greliny u osób szczupłych, białe punkty u osób otyłych. Na dole poziomy greliny u osób po bypasse żołądka. [wg Cummings i wsp. 2006].....	26
Ryc. 6. 24-godzinny profil poziomu greliny całkowitej, greliny acylowanej (aktywnej), glukozy i insuliny u zdrowych mężczyzn. Na wykresie zaznaczony jest czas snu (czarna linia pozioma) oraz godziny posiłków (przerwana linia pionowa) [wg Spiegel i wsp. 2011].	27
Ryc. 7. Poziomy aktywnej (góra) i całkowitej (dół) greliny w czasie po podaniu alkoholu (czarne punkty) i wody (białe punkty) u 12 zdrowych osób. [wg Calissendorff i wsp. 2006].	36
Ryc. 8. Schemat uzależniania zwierząt.....	42
Ryc. 9. Fizjologiczne poziomy greliny aktywnej i całkowitej u szczurów Wistar, WLP i WHP.....	46
Ryc. 10. Poziomy greliny aktywnej u szczurów Wistar po jednorazowym dootrzewnowym podaniu etanolu.	48
Ryc. 11. Poziomy greliny całkowitej u szczurów Wistar po jednorazowym dootrzewnowym podaniu etanolu.	48
Ryc. 12. Poziomy etanolu we krwi u szczurów Wistar po jego jednorazowym dootrzewnowym podaniu.	49
Ryc. 13. Poziomy greliny aktywnej w surowicy u szczurów WLP i WHP po jednorazowym dootrzewnowym podaniu etanolu.....	50
Ryc. 14. Poziomy greliny całkowitej w surowicy u szczurów WLP i WHP po jednorazowym dootrzewnowym podaniu etanolu.....	51
Ryc. 15. Poziomy etanolu we krwi u szczurów WLP i WHP po jednorazowym dootrzewnowym podaniu etanolu.	51
Ryc. 16. Zmiany temperatury ciała u szczurów WHP po 30 minucach od podania etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.) w pierwszej i w kolejnych dobach doświadczenia.	53
Ryc. 17. Zmiany temperatury ciała u szczurów WHP po 60 minucach od podania etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.) w pierwszej i w kolejnych dobach doświadczenia.	53

Ryc. 18. Zmiany temperatury ciała u szczurów WHP po 90 minutach od podania etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.) w pierwszej i w kolejnych dobach doświadczenia.	54
Ryc. 19. Poziomy greliny aktywnej i całkowitej w surowicy u szczurów WHP po wielokrotnym (8x) podaniu etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.).	54
Ryc. 20. Poziomy greliny aktywnej i całkowitej u szczurów Wistar, (pozbawionych dostępu do alkoholu), niepreferujących (NP) i preferujących (PR) picie alkoholu.	56
Ryc. 21. Poziomy greliny aktywnej i całkowitej u szczurów Wistar (pozbawionych dostępu do alkoholu), WLP i WHP (po okresie preferencji).	57
Ryc. 22. Poziomy greliny aktywnej u szczurów NP, PR, WLP i WHP po okresie preferencji picia alkoholu.	59
Ryc. 23. Poziomy greliny całkowitej u szczurów NP, PR, WLP i WHP po okresie preferencji picia alkoholu.	60
Ryc. 24. Ilość wypitego etanolu u szczurów NP, PR, WLP i WHP po okresie preferencji picia alkoholu.	60
Ryc. 25. Poziom greliny aktywnej w surowicy u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu akamprozatu (500 mg/kg m.c., p.o.).	62
Ryc. 26. Poziom greliny całkowitej w surowicy u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu akamprozatu (500 mg/kg m.c., p.o.).	62
Ryc. 27. Wpływ akamprozatu (500 mg/kg m.c. p.o.) na ilość wypijanego etanolu przez szczury NP i PR.	63
Ryc. 28. Poziom greliny aktywnej i całkowitej w surowicy u szczurów WLP i WHP po wielokrotnym (28x) podaniu akamprozatu (500 mg/kg m.c. p.o.).	64
Ryc. 29. Wpływ akamprozatu (500 mg/kg m.c. p.o.) na ilość wypijanego etanolu przez szczury WLP i WHP.	64
Ryc. 30. Poziom greliny aktywnej w surowicy u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu nalteksonu (0,1 mg/kg m.c. i.p.); przed rozpoczęciem picia (wyjściowa), po okresie picia bez leku (po preferencji), po okresie picia i po leku (po leku).	66
Ryc. 31. Poziom greliny całkowitej w surowicy u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu nalteksonu (0,1 mg/kg m.c. i.p.); przed rozpoczęciem picia (wyjściowa), po okresie picia bez leku (po preferencji), po okresie picia i po leku (po leku).	67
Ryc. 32. Wpływ naltreksonu (0,1 mg/kg m.c. i.p.) na ilość wypijanego etanolu przez szczury NP i PR.	67
Ryc. 33. Zmiany temperatury ciała u szczurów WHP po 30 minutach od podania etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.) i kudzu (500 mg/kg m.c., p.o.) w pierwszej i w kolejnych dobach doświadczenia.	70
Ryc. 34. Zmiany temperatury ciała u szczurów WHP po 60 minutach od podania etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.) i kudzu (500 mg/kg m.c., p.o.) w pierwszej i w kolejnych dobach doświadczenia.	70
Ryc. 35. Zmiany temperatury ciała u szczurów WHP po 90 minutach od podania etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.) i kudzu (500 mg/kg m.c., p.o.) w pierwszej i w kolejnych dobach doświadczenia.	71

Ryc. 36. Poziomy greliny aktywnej w surowicy u szczurów WHP po wielokrotnym (8x) podaniu etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.) i kudzu (500 mg/kg m.c., p.o.).....	71
Ryc. 37. Poziomy greliny całkowitej w surowicy u szczurów WHP po wielokrotnym (8x) podaniu etanolu (3,0 g/kg m.c., i.p.) i kudzu (500 mg/kg m.c., p.o.).....	72
Ryc. 38. Poziom greliny aktywnej w surowicy u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu kudzu (500 mg/kg m.c. p.o.).....	73
Ryc. 39. Ilość wypijanego etanolu/kg m.c./dobę przez szczury NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu kudzu (500 mg/kg m.c., p.o.).....	74
Ryc. 40. Poziom greliny aktywnej w surowicy u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podawaniu daidzyny (40 mg/kg m.c. p.o.).....	75
Ryc. 41. Poziom greliny całkowitej w surowicy u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu daidzyny (40 mg/kg m.c. p.o.).....	75
Ryc. 42. Ilość wypitego etanolu/kg m.c./dobę u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu daidzyny (40 mg/kg m.c. p.o.).....	76
Ryc. 43. Poziomy alkoholu we krwi u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu daidzyny (40 mg/kg m.c. p.o.).....	76
Ryc. 44. Poziom greliny aktywnej i całkowitej w surowicy u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu pueraryny (150 mg/kg m.c. p.o.).....	78
Ryc. 45. Ilość wypitego etanolu/kg m.c. masy ciała u szczurów NP i PR po wielokrotnym (28x) podaniu pueraryny (150 mg/kg m.c. p.o.).....	79

TABELE:

Tab. 1. Zmiany masy oraz ilości wypijanej wody u szczurów Wistar, (pozbawionych dostępu do alkoholu) oraz szczurów WLP i WHP (również pozbawionych dostępu do alkoholu).....	47
Tab. 2. Analiza masy szczurów Wistar po jednorazowym podaniu etanolu.....	47
Tab. 3. Analiza masy szczurów WLP i WHP po jednorazowym podaniu etanolu.....	50
Tab. 4. Zmiany masy ciała użytych szczurów WHP w badaniu rozwoju tolerancji na działanie etanolu.....	55
Tab. 5. Zmiany masy, ilości wypijanego etanolu oraz sumy wypijanych płynów u szczurów Wistar, (pozbawionych dostępu do alkoholu), niepreferujących (NP) i preferujących (PR) picie alkoholu.....	55
Tab. 6. Zmiany masy, ilości wypijanego etanolu oraz sumy wypijanych płynów u szczurów Wistar, (pozbawionych dostępu do alkoholu) oraz szczurów WLP i WHP (po okresie preferencji).....	57
Tab. 7. Wpływ picia alkoholu na zmiany stężenia greliny u szczurów WHP i WLP.....	58
Tab. 8. Zmiany masy szczurów oraz sumy wypijanych płynów przez zwierzęta NP, PR, WLP i WHP po okresie preferencji.....	59
Tab. 9. Wpływ akamprozatu na zmian masy oraz sumaryczne ilości wypijanych płynów przez szczury PR i NP.....	61
Tab. 10. Wpływ akamprozatu na zmian masy oraz sumaryczne ilości wypijanych płynów przez szczury WLP i WHP.....	65
Tab. 11. Wpływ naltreksonu na zmiany masy oraz sumaryczne ilości wypijanych płynów przez szczury NP i PR.....	66
Tab. 12. Zmiany masy ciała użytych szczurów WHP w badaniu wpływu kudzu na rozwój tolerancji etanolowej.....	69
Tab. 13. Zmiany masy ciała oraz suma wypijanych płynów przez szczury NP i PR po wielokrotnym podaniu kudzu.....	73
Tab. 14. Zmiany masy ciała oraz suma wypijanych płynów przez szczury Wistar po wielokrotnym podawaniu daidżyny.....	77
Tab. 15. Zmiany masy ciała oraz suma wypijanych płynów przez szczury NP i PR po wielokrotnym podawaniu pueraryny.....	79

10. PIŚMIENICTWO

Abizaid A., Gao Q., Horvath T.L. Thoughts for food: brain mechanisms and peripheral energy balance. *Neuron* 51 (2006a) 691–702.

Abizaid A., Liu Y., Andrews Y., Shanabrough M., Borok E., Elsworth J., Roth R., Sleeman M., Picciotto M., Tschop M., Gao B., Horvath T. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J. Clin Invest* 116 (2006b) 3229–3239.

Adams C.E., Greenway F.L., Brantley P.J. Lifestyle factors and ghrelin: critical review and implications for weight loss maintenance. *Obesity Reviews* 12 (2011) e211–e218.

Addolorato G., Capristo E., Leggio L., Ferrulli A., Abenavoli L., Malandrino N., Farnetti S., Domenicali M., D'Angelo C., Vonghia L., Mirijello A., Cardone S., Gasbarrini G. Relationship between ghrelin levels, alcohol craving and nutritional status in current alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 30 (2006) 1933–1937.

Anderson L.L., Jęftinija S., Scanes C.G. Growth hormone secretion: molecular and cellular mechanisms and in vivo approaches. *Exp Biol Med* 229 (2004) 291–302.

Andrews P.L., Sanger G.J. Abdominal vagal afferent neurones: an important target for the treatment of gastrointestinal dysfunction. *Curr Opin Pharmacol* 2 (2002) 650–656.

Argetsinger L.S., Carter-Su C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol Rev* 76 (1996) 1089–1107.

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* 86 (2001) 4753–4758.

Asakawa A., Inui A., Fujimiya M., Sakamaki R., Shinfuku N., Ueta Y. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* 54 (2005) 18–24.

Asakawa A., Inui A., Kaga T., Yuzuriha H., Nagata T., Fujimiya M., Katsuura G., Makino S., Fujino M., Kasuga M. A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice. *Neuroendocrinology* 74 (2001) 143–147.

Atcha Z., Chen W.S., Ong A.B., Wong F.K., Neo A., Browne E.R., Witherington J., Pemberton D.J. Cognitive enhancing effects of ghrelin receptor agonists. *Psychopharmacology* 206 (2009) 415–27.

Badaoui A., Saeger C., Duchemin J., Gihousse D., Timary P., Stärkel P. Alcohol dependence is associated with reduced plasma and fundic ghrelin levels. *Eur J Clin Invest* 38 (2008) 397–403.

Badia-Elder N.E., Stewart R.B., Powrozek T.A., Roy K.F., Murphy J.M., Li T.K. Effects of neuropeptide Y (NPY) on oral ethanol intake in Wistar, alcohol-preferring (P), and non-preferring (NP) rats. *Alcohol Clin Exp Res* 25 (2001) 386–390.

Badia-Elder N.E., Stewart R.B., Powrozek T.A., Roy K.F., Murphy J.M., Li T.K. Effects of neuropeptide Y on sucrose and ethanol intake and on anxiety-like behavior in high alcohol drinking (HAD) and low alcohol drinking (LAD) rats. *Alcohol Clin Exp Res* 27 (2003) 894–899.

Baldelli R., Otero X.L., Camina J.P., Gualillo O., Popovic V., Dieguez C., Casanueva F.F. Growth hormone secretagogues as diagnostic tools in disease states. *Endocrine* 14 (2001) 95–99.

Bandyopadhyay B.C., Poddar M.K. Hypothalamic GABAergic activity and T-cell proliferation in aged mammals: effects of dietary protein. *Neurochem Int* 32 (1998) 191–196.

Banks W., Burney B.O., Robinson S.M. Effects of triglycerides, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood–brain barrier. *Peptides* 29 (2008) 2061–2065.

Banks W., Tschop M., Robinson S.M., Heiman M.L. Extent and direction of ghrelin transport across the blood–brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther* 302 (2002) 822–827.

Beaumont N.J., Skinner V.O., Tan T.M., Ramesh B.S., Byrne D.J., MacColl G.S., Keen J.N., Bouloux P.M., Mikhailidis D.P., Bruckdorfer K.R., Vanderpump M.P., Srai K.S. Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J Biol Chem* 278 (2003) 8877–8880.

Bellone S., Rapa A., Vivenza D., Castellino N., Petri A., Bellone J., Me E., Broglio F., Prodam F., Ghigo E., Bona G. Circulating ghrelin levels as function of gender, pubertal status and adiposity in childhood. *J Endocrinol Invest* 25 (2002) 13–15.

Benlhabib E., Baker J.I., Keyler D.E., Singh A.K. Kudzu root extract suppresses voluntary alcohol intake and alcohol withdrawal symptoms in P rats receiving free access to water and alcohol. *Journal of Medicinal Food* 7(2004) 168–179.

Bennett P.A., Thomas G.B., Howard A.D., Feighner S.D., van der Ploeg L.H., Smith R.G., Robinson I.C. Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R.) expression is regulated by growth hormone in the rat. *Endocrinology* 138 (1997) 4552–4557.

Bianchi V., Ivaldi A., Raspagni A., Arfini C., Vidali M. Assessment and detection. Use of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and a combination of GGT and CDT (GGT–CDT) to assess heavy alcohol consumption in traffic medicine. *Alcohol Alcohol* 45 (2010) 247–251.

Bien T.H., Burge R. Smoking and drinking: a review of the literature. *Int J Addict* 25 (1990)1429–1454.

Bluet-Pajot M., Epelbaum J., Gourdjji D., Hammond C., Kordon C. Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion. *Cell Mol Neurobiol* 18 (1998) 101–123.

- Bowers C.Y. Growth hormone-releasing peptide (GHRP). *Cell Mol Life Sci* 54 (1998) 1316–1329.
- Brunetti L., Recinella L., Orlando G., Michelotto B., Di Nisio C., Vacca M. Effects of ghrelin and amylin on dopamine, norepinephrine and serotonin release in the hypothalamus. *Eur J Pharmacol.* 15 (2002) 189-92.
- Brzozowski T., Konturek P., Konturek S., Kwiecie S., Drozdowicz D., Bielanski W. Exogenous and endogenous ghrelin in gastroprotection against stress-induced gastric damage. *Regul Pept* 120 (2004) 39–51.
- Calissendorff J., Danielsson O., Brismar K., Rojdmarm S. Alcohol ingestion does not affect serum levels of peptide YY but decreases both total and octanoylated ghrelin levels in healthy subjects. *Metabolism* 55 (2006) 625–1629.
- Calissendorff J., Danielsson O., Brismar K., Rojdmarm S. Inhibitory effect of alcohol on ghrelin secretion in normal man. *Eur J Endocrinol* 152 (2005) 743–747.
- Cardoso J.M.N., Barbosa A., Ismail F., Pombo S. Neter alcoholic typology(NAT). *Alcohol Alcohol* 41 (2006) 133-139.
- Carlini V., Martini A.C., Schiöth H.B., Ruiz R.D., Fiore de Cuneo M., de Barioglio S.R. Decreased memory for novel object recognition in chronically food-restricted mice is reversed by acute ghrelin administration. *Neuroscience* 153 (2008) 88.
- Carlini V., Monzón M., Varas M., Cragolini A., Schiöth H., Scimonelli T. Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 299 (2002) 739–43.
- Carlini V., Schiöth H.B., Debarioglio S.R. Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352 (2007) 907–912.
- Carlini V., Varas M.M., Cragolini A.B., Schiöth H.B., Scimonelli T.N., de Barioglio S.R. Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (2004) 635–641.
- Carlini V.P., Ghersi M. Ghrelin and memory: Differential effects on acquisition and retrieval. *Peptides* 31 (2010a) 1190-1193
- Carlini V.P., Perez M.F., Salde E., Schiöth H.B., Ramirez O.A., de Barioglio S.R. Ghrelin induced memory facilitation implicates nitric oxide synthase activation and decrease in the threshold to promote LTP in hippocampal dentate gyrus. *Physiol Behav.* 101 (2010b) 117-23.
- Carter-Su C., King A.P., Argetsinger L.S., Smit L.S., Vanderkuur J., Campbell G.S. Signalling pathway of GH. *Endocr J* 43 (1996) S65–S70.
- Casanueva F.F., Dieguez C., Ghrelin a new hormone implicated in the regulation of growth hormone secretion and body energy homeostasis. *Growth, Genetics & Hormones* 20 (2004) 1-8.

- Cassoni P., Papotti M., Ghe 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* 86 (2001) 1738–1745.
- Castaneda T.R., Tong J., Datta R., Culler M., Tschöp M.H. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Frontiers in Neuroendocrinol* 2010 (31) 44–60.
- Chau P., Stomberg R., Fagerberg A., Soderpalm B., Ericson M. Glycine receptors involved in acamprosate's modulation of accumbal dopamine levels: an in vivo microdialysis study. *Alcohol Clin Exp Res* 34 (2010) 32–38.
- Chen C., Wu D., Clarke I.J. Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs. *J. Endocrinol.* 148 (1996) 381–386.
- Chen C.Y., Inui A., Asakawa A., Fujino K., Kato I., Chen C.C. Des-acyl ghrelin acts by CRF type 2 receptors to disrupt fasted stomach motility in conscious rats. *Gastroenterology* 129 (2005) 8–25.
- Chrostek L., Cylwik B., Korcz W., Krawiec A., Koput A., Supronowicz Z., Szmitkowski M. Serum free sialic acid as a marker of alcohol abuse. *Alcohol Clin Exp Res* 31 (2007) 996–1001.
- Cloninger C.R. Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. *Science* 236 (1987) 410–416.
- Cloninger C.R., Sigvardsson S., Gilligan SB., von Knorring AL., Reich T., Bohman M. Genetic heterogeneity and the classification of alcoholism. *Advances in Alcohol & Substance Abuse* 7 (1988) 3–16.
- Cone R., Cowley M.A., Butler A.A., Fan W., Marks D.L., Low M.J. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 (2001) S63–S67.
- Cowley M., Smith R.G., Diano S., Tschop M., Pronchuk N., Grove K.L., Strasburger C.J., Bidlingmaier M., Esterman M., Heiman M.L., Garcia-Segura L.M., Nillni E.A., Mendez P., Low M.J., Sotonyi P., Friedman J.M., Liu H., Pinto S., Colmers W.F., Cone R.D., Horvath T.L. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37 (2003) 649–661.
- Cummings D.E. Ghrelin and the short-time- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav* 89 (2006) 71–84.
- Cummings D.E., Clement K., Purnell J.Q., Vaisse C., Foster K.E., Frayo R.S., Schwartz M.W., Basdevant A., Weigle D.S. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat Med* 8 (2002a) 643–644.
- Cummings D.E., Frayo R.S., 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* 287 (2004) E297–E304.

- Cummings D.E., Purnell J.Q., Frayo R.S., Schmidova K., Wisse B.E., Weigle D.S. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50 (2001) 1714–1719.
- Cummings D.E., Weigle D.S., Frayo R.S., Breen P.A., Ma M.K., Dellinger E.P., Purnell J.Q. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 346 (2002b) 1623–1630.
- Cuntz U., Fruhauf E., Wawarta R., Tschop M., Folwaczny C., Riepl R., Lehnert P., Fichter M., Otto B. A role for the novel weight-regulating hormone ghrelin in anorexia nervosa. *Am Clin Lab* 21 (2002) 22–23.
- Daoust M., Lhuentre J.P., Moore N., Saligant C., Filipo J.L., Boismare F. Is initial sensitivity to ethanol correlated with alcohol preference in alcohol-drinking and non-drinking rats? *Alcohol Alcohol*, 22 (1987) 409-414.
- Date Y., Murakami N., Toshinai K., Matsukura S., Nijima 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* 123 (2002) 1120–1128.
- 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* 280 (2001) 904–907.
- Davis K.W., Wellman P.J., Clifford P.S. Augmented cocaine conditioned place preference in rats pretreated with systemic ghrelin. *Regul Pept* 140 (2007)148–152.
- Dawson D.A., Archer L. Gender differences in alcohol consumption:effects of measurement. *Br J Addict* 87 (1992) 119–123.
- De Vriese C., Hacquebard M., Gregoire F., Carpentier Y., Delporte C. Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins. *Endocrinology* 148 (2007) 2355–2362.
- Deghenghi R., Broglio F., Papotti M., Muccioli G., and Ghigo E. Targeting the ghrelin receptor: orally active GHS and cortistatin analogs. *Endocrine* 22 (2003) 13–18.
- Del Arbol J.L., Aguirre J.C., Raya J., Rico J., Ruiz-Requena M.E., Miranda M.T. Plasma concentrations of b-endorphin, adrenocorticotropin hormone and cortisol in drinking and abstinent chronic alcoholics. *Alcohol* 12 (1995) 525–529.
- Del Parigi A., Tschop M., Heiman M.L., Salbe A.D., Vozarova B., Sell S.M., Bunt J.C., Tataranni P.A. High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in prader-willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002) 5461–5464.
- Delzenne N., Blundell J., Brouns F., Cunningham K., De Graaf K., Erkner A., Lluch A., Mars M., Peters H.P. Westerterp-Plantenga M. Gastrointestinal targets of appetite regulation in humans. *Obes Rev* 11 (2010) 234–250.
- Di Chiara G. Dopamine in disturbances of food and drug motivated behavior: a case of homology? *Physiol Behav* 86 (2005) 9–10.

- Diano S., Farr S.A., Benoit S.C., Mcnay E.C., da Silva I., Horvath B. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat Neurosci* 9 (2006) 381–388.
- Dickson S.L., Bailey A.R., Leng G. Growth hormone (GH) secretagogues and neuroendocrine regulation of GH secretion. *Growth Horm IGF Res* 9 (1999) 89–91.
- Diehl A., Croissant B., Batra A., Mundle G., Nakovics H., Mann K. Alcoholism in women: is it different in onset and outcome compared to men? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257 (2007) 344–351.
- Diehl A., Ulmer L., Mutschler J., Herre H., Krumm B., Croissant B., Mann K., Kieler F. Why is disulfiram superior to acamprosate in the routine clinical setting? A retrospective long-term study in 353 alcohol-dependent patients. *Alcohol Alcohol* 45 (2010) 271–277.
- 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* 120 (2004) 23–32.
- Druce M., Bloom S. Central regulators of food intake. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 6 (2003) 361–367.
- Dyr W., Kostowski W. Animal model of ethanol abuse: rats selectively bred for high and low voluntary alcohol intake. *Acta Polon Pharm - Drug Res* 57 (2000) S90-S92.
- Dyr W., Kostowski W. Warsaw high-preferring (WHP) and Warsaw low-preferring (WLP) lines of rats selectively bred for high and low voluntary ethanol intake: preliminary phenotypic characterization. *Alcohol* 42 (2008) 161-170.
- Dyr W., Krząścik P., Dudek K., Witanowska A., Dzierzkowska J., Kostowski W. A new line of Wistar rats selected for preference for alcohol: behavioral characteristics. *Alkoholizm i Narkomania* 37 (1999) 525-543.
- Dzaja A., Dalal M.A., Himmerich H., Uhr M., Pollmacher T., Schuld A. Sleep enhances nocturnal plasma ghrelin levels in healthy subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286 (2004) E963-E967.
- Egecioglu E., Jerlhag E., Salomé N., Skibicka K.P., Haage D., Bohlooly-Y. M., Andersson D., Bjursell M., Perrissoud D., Engel J.A., Dickson S.L. Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents. *Addict Biol* 15 (2010) 304-11.
- Ehlers C.L., Chaplin R.I., Wall T.L., Lumeng L., Li T.K., Owens M.J., Nemeroff C.B. Corticotropin releasing factor (CRF): Studies in alcohol preferring and non-preferring rats. *Psychopharmacology* 106 (1992) 359–364.
- Ehlers C.L., Li T.K., Lumeng L., Hwang B.H., Somes C., Jimenez P., Mathé A.A. Neuropeptide Y levels in ethanol-naïve alcohol-preferring rats and in Wistar rats after ethanol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 22 (1998) 1778–1782.

- El Eter E., Al Tuwajjiri A., Hagar H., Arafa M. In vivo and in vitro antioxidant activity of ghrelin: attenuation of gastric ischemic injury in the rat. *J Gastroenterol Hepatol* 22 (2007) 1791–9.
- Engel J.A., Fahlke C., Hulthe P., Hard E., Johannessen K., Snape B., Svensson L. Biochemical and behavioral evidence for an interaction between ethanol and calcium channel antagonists. *J Neural Transm* 74 (1988) 181–193.
- Engeli S., Bohnke J., Feldpausch M., Gorzelniak K., Janke J., Bátkai S., Pacher P., Harvey-White J., Luft F.C., Sharma A.M., Jordan J. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 54 (2005) 2838–2843.
- Ericson M., Blomqvist O., Engel J.A., Söderpalm B. Voluntary ethanol intake in the rat and the associated accumbal dopamine overflow are blocked by ventral tegmental mecamylamine. *Eur J Pharmacol* 358 (1998) 189–196.
- Falk D.E., Yi H.Y., Hiller-Sturmhofel S. An epidemiologic analysis of co-occurring alcohol and tobacco use and disorders: findings from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Alcohol Res Health* 29 (2006) 162–171.
- Feighner S.D., Tan C.P., McKee K.K., Palyha O.C., Hreniuk D.L., Pong S.S., Austin C.P., Figueroa D., MacNeil D., Cascieri M.A., Nargund R., Bakshi R., Abramovitz M., Stocco R., Kargman S., O'Neill G., Van Der Ploeg L.H., Evans J., Patchett A.A., Smith R.G., Howard A.D. Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system. *Science* 284 (1999) 2184–2188.
- Froehlich J.C., Zink R.W., Li T.K., Christian J.C. Analysis of heritability of hormonal responses to alcohol in twins: b-endorphin as a potential biomarker of genetic risk for alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 24 (2000) 265–277.
- Gao Q., Tamas L., Horvath T.L. Neurobiology of Feeding and Energy Expenditure. *Annu Rev Neurosci* 30 (2007) 367–398.
- Gauna C., Delhanty P.J., Hofland L.J., Janssen J.A., Broglio F., Ross R.J. Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 90 (2005) 1055–1060.
- Gaytan F., Barreiro M.L., Chopin L.K., Herington A.C., Morales C., Pinilla L., Casanueva F.F., Aguilar E., Dieguez C., Tena-Sempere M. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (2003) 879–887.
- Geloneze B., Tambascia M.A., Pilla V.F., Geloneze S.R., Repetto E.M., Pareja J.C. Ghrelin: a gut-brain hormone: effect of gastric bypass surgery. *Obesity Surg* 13 (2003) 17–22.
- Gewiss M., Heidbreder C., Opsomer L., Durbin P., De Witte P. Acamprosate and diazepam differentially modulate alcohol-induced behavioural and cortical alterations in rats following chronic inhalation of ethanol vapour. *Alcohol* 26 (1991) 129–137.

Ghigo E., Arvat E., Broglio F., Giordano R., Gianotti L., Muccioli G., Papotti M., Graziani A., Bisi G., Deghenghi R., Camanni F. Endocrine and non-endocrine activities of growth hormone secretagogues in humans. *Horm Res* 51 (1999) S9–S15.

Gianoulakis C., De Waele J.P., Thavundayil J. Implication of the endogenous opioid system in excessive ethanol consumption. *Alcohol* 13 (1996) 19–23.

Global status report on alcohol and health. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data (2011) http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/index.html

Gnanapavan S., Kola B., Bustin S.A., Morris D.G., McGee P., Fairclough P., Bhattacharya S., Carpenter R., Grossman A.B., Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R., in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002) 2988.

Gomez G., Englander E.W., Greeley G.H. Jr. Nutrient inhibition of ghrelin secretion in the fasted rat. *Regul Pept* 117 (2004) 33–6.

Grahame N.J., Mosemiller A.K., Low M.J., Froehlich J.C. Naltrexone and alcohol drinking in mice lacking b-endorphin by site-directed mu- tagenesis. *Pharmacol Biochem Behav* 67 (2000) 759–766.

Granata R., Baragli A., Settanni F., Scarlatti F., Ghigo E. Unraveling the role of the ghrelin gene peptides in the endocrine pancreas. *J Mol Endocrinol* 45 (2010) 107–118.

Grisel J.E., Mogil J.S., Grahame N.J., Rubinstein M., Belknap J.K., Crabbe J.C., Low M.J. Ethanol oral self administration is increased in mutant mice with decreased b-endorphin expression. *Brain Res* 835 (1999) 62–67.

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

Guan X.M., Yu H., Palyha O.C., McKee K.K., Feighner S.D., Sirinathsinghji D.J., Smith R.G., Van der Ploeg L.H., Howard A.D. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res* 48 (1997) 23–29.

Gutierrez J., Solenberg P., Perkins D., Willency J., Knierman M., Jin Y. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (2008) 6320–6325.

Hammoumi S., Naassila M., Daoust M. Experimental findings in the study of the reduction of alcohol intake. *Eur Neuropsychopharmacology* 7 (1997) S337–S340.

Harrold J., Dovey T., Cai X.J., Halford J.C., Pinkney J. Autoradiographic analysis of ghrelin receptors in the rat hypothalamus. *Brain Res* 1196 (2008) 59–64.

- Hattori N., Saito T., Yagyu T., Jiang B.H., 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* 86 (2001) 4284–4291.
- Hauser J., Rybakowski J. Three clusters of male alcoholics. *Drug Alcohol Depend* 48 (1997) 243-250.
- Heijboer A.C., van den Hoek A.M., Parlevliet E.T., Havekes L.M., Romijn J.A., Pijl H. Ghrelin differentially affects hepatic and peripheral insulin sensitivity in mice. *Diabetologia* 49 (2006) 732–8.
- Heilig M., Egli M. Pharmacological treatment of alcohol dependence: Target symptoms and target mechanisms. *Pharmacol Ther* 111 (2006) 855–876.
- Heinälä P., Alho H., Kiiänmaa K., Lönnqvist J., Kuoppasalmi K., Sinclair J.D. Targeted use of naltrexone without prior detoxification in the treatment of alcohol dependence: a factorial double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Psychopharmacol* 21(2001) 287-92.
- Herz A. Endogenous opioid system and alcohol addiction. *Psychopharmacology* 129 (1997) 99–111.
- Heyser C.J., Schulteis G., Koob G.F. Increased ethanol self-administration after a period of imposed ethanol deprivation in rats trained in a limited access paradigm. *Alcohol Clin Exp Res* 21 (1997) 784-791.
- Hicks M.P., Olive M.F. Whole Genome Transcriptional Profiling of The Mouse Frontal Cortex Following Repeated Acamprosate Administration. Proceedings of the 2nd WSEAS International Conference on BIOMEDICAL ELECTRONICS and BIOMEDICAL INFORMATICS (BEBI '09) Moscow, Russia August 20-22, (2009) 180-183.
- Hill K.G., Sable H.J., Ferraro III F.J., Kiefer S.W. Chronic naltrexone treatment and ethanol responsivity in outbred rats. *Alcohol Clin Exp Res* 34 (2010) 272–279.
- Hillemacher T., Bleich S., Frieling H., Schanze A., Wilhelm J., Sperling W., Kornhuber J., Kraus T. Evidence of an association of leptin serum levels and craving in alcohol dependence. *Psychoneuroendocrinology* 32 (2006) 87–90.
- Horvath T.L., Diano S., Sotonyi P., Heiman M., Tschop M. Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance – an hypothalamic perspective. *Endocrinology* 142 (2001) 4163–4169.
- Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by posttranslational processing. *J Biol Chem* 278 (2003) 64–70.
- Hosoda H., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 279 (2000b) 909–913.

- Hosoda H., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K. Purification and characterization of rat des-Gln14-ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem* 275 (2000a) 21995–22000.
- Hou Z., Miao Y., Gao L., Pan H., Zhu S. Ghrelin-containing neuron in cerebral cortex and hypothalamus linked with the DVC of brainstem in rat. *Regul Pept* 134 (2006) 126–131.
- Howard A., Feighner S.D., Cully D.F., Arena J.P., Liberatore P.A., Rosenblum C.I., Hamelin M., Hreniuk D., Palyha O. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273 (1996) 974–977.
- Hyman S.E., Malenka R.C., Nestler E.J., Hyman S.E., Malenka R.C., Nestler E.J. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29 (2006) 565–598.
- Inhoff T., Monnikes H., Noetzel S., Stengel A., Goebel M., Dinh T., Riedl A., Bannert N. Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides* 29 (2008) 2159–2168.
- Isomoto H., Ueno H., Saenko V.A., Mondal M.S., Nishi Y., Kawano N., Ohnita K., Mizuta Y., Ohtsuru A., Yamashita S., Nakazato M., Kohno S. Impact of *Helicobacter pylori* infection on gastric and plasma ghrelin dynamics in humans. *Am J Gastroenterol* 100 (2005) 1711–20.
- Jang K.L., Livesley W.J., Vernon P.A. Gender-specific etiological differences in alcohol and drug problems: a behavioural genetic analysis. *Addiction* 92 (1997) 1265–1276.
- Jerlhag E. Systemic administration of ghrelin induces conditioned place preference and stimulates accumbal dopamine. *Addict Biol* 13 (2008b) 358–363.
- Jerlhag E., Eggecioglu E., Dickson S., Andersson M., Svensson L., Engel J.A. Ghrelin stimulates locomotor activity and accumbal dopamine overflow via central cholinergic systems in mice: implications for its involvement in brain reward. *Addict Biol* 11 (2006) 45–54.
- Jerlhag E., Eggecioglu E., Dickson S., Douhan A., Svensson L., Engel J.A. Ghrelin administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens. *Addict Biol* 12 (2007) 6–16.
- Jerlhag E., Eggecioglu E., Dickson S., Engel J. Glutamatergic regulation of ghrelin-induced activation of the mesolimbic dopamine system. *Addiction Biology*. 16 (2011) 82–91.
- Jerlhag E., Eggecioglu E., Dickson S.L., Svensson L., Engel J.A. Alpha-conotoxin MII-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are involved in mediating the ghrelin-induced locomotor stimulation and dopamine overflow in nucleus accumbens. *Eur Neuropsychopharmacol* 18 (2008a) 508–518.
- Jerlhag E., Eggecioglu E., Landgren S., Salome N., Heilig M., Moechars D. Requirement of central ghrelin signaling for alcohol reward. *Proc Natl Acad Sci USA* 106 (2009) 11318–11323.

- Jerlhag E., Grötli M., Luthman K., Svensson L., Engel J.A. Role of the subunit composition of central nicotinic acetylcholine receptors for the stimulatory and dopamine-enhancing effects of ethanol. *Alcohol Alcohol* 41 (2006) 486–493.
- Johnson B.A. Medication treatment of different types of alcoholism. *Am J Psychiatry* 167 (2010) 630-9.
- Johnson B.A. Progress in the development of topiramate for treating alcohol dependence: From a hypothesis to a proof-of-concept study. *Alcohol Clin Exp Res* 28 (2004c) 1137-1144.
- Johnson B.A. Topiramate-induced neuromodulation of cortico-mesolimbic dopamine function: A new vista for the treatment of comorbid alcohol and nicotine dependence? *Addict Behav* 29 (2004a) 1465-1479.
- Johnson B.A. Update on neuropharmacological treatments for alcoholism: Scientific basis and clinical findings. *Biochem Pharmacol* 75 (2008) 34 – 56.
- Johnson B.A. Uses of topiramate in the treatment of alcohol dependence. *Expert Rev Neurotherapeutics* 4 (2004b) 751-758.
- Kalra S.P., Kalra P.S. Overlapping and interactive pathways regulating appetite and craving. *J Addict Dis* 23 (2004) 5–21.
- Kamegai J., Tamura H., Shimizu T., Ishii S., Sugihara H., Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 50 (2001) 2438–2443.
- Karydis I., Tolis A., Tolis G. New GH secretagogues and potential usefulness in thalassemia. *J Pediatr Endocrinol Metab* 11 (1998) 857–862.
- Kenna G.A., McGeary J., Swift R.M. Pharmacotherapy, pharmacogenomics, and the future of alcohol dependence treatment, part 1. *Am J Health Syst Pharm* 61 (2004a) 2272-2279.
- Kenna G.A., McGeary J., Swift R.M. Pharmacotherapy, pharmacogenomics, and the future of alcohol dependence treatment, part 2. *Am J Health Syst Pharm* 61 (2004b) 2280-2388.
- Keung W.M. Anti-dipsotropic isoflavones: the potential therapeutic agents for alcohol dependence. *Med Res Rev* 23 (2003) 669-696.
- Keung W.M. i Vallee B.L. Kudzu root: an ancient chinese source of modern antidipsotropic agents. *Phytochemistry* 4 (1998) 499-506.
- Keung W.M., Lazo O., Kunze L., Vallee B.L. Daidzin suppresses ethanol consumption by Syrian golden hamsters without blocking acetaldehyde metabolism. *Biochemistry* 92 (1995) 8990-8993.
- Kiefer F., Jahn H., Jaschinski M., Holzbach R., Wolf K., Naber D., Wiedemann K. Leptin: A modulator of alcohol craving? *Biol Psychiatry* 49 (2001) 782–787.

- Kiefer F., Jahn H., Otte C., Nakovics H., Wiedemann K. Effects of treatment with acamprosate on β -endorphin plasma concentration in humans with high alcohol preference. *Neurosci Lett* 404 (2006) 103–106.
- Kiefer F., Jiménez-Arriero M.A., Klein O., Diehl A., Rubio G. Cloninger's typology and treatment outcome in alcohol-dependent subjects during pharmacotherapy with naltrexone. *Addiction Biology* 13 (2007) 124–129.
- Kim D.J., Yoon S.J., Choi B., Kim T.S., Woo Y.S., Kim W., Myrick H., Peterson B.S., Choi Y.B., Kim Y.K., Jeong J. Increased fasting plasma ghrelin levels during alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol* 40 (2005) 76–79.
- Kim M.J., Lee J.S., Ha O.M., Jang J.Y., Cho S.Y. Effects of *Pueraria thunbergiana* Bentham water extracts on hepatic alcohol metabolic enzyme system in rats. *J Korean Society of Food Science Nutrition* 31 (2002) 92–97.
- Kineman R., Gahete M.D., Luque R.M. Identification of a mouse ghrelin gene transcript that contains intron 2 and is regulated in the pituitary and hypothalamus in response to metabolic stress. *J Mol Endocrinol* 38 (2007) 511–521.
- Kirkham T.C., Williams C.M., Fezza F., Di Marzo V. Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. *Br J Pharmacol* 136 (2002) 550–557.
- Kohno D., Gao H.Z., Muroya S., Kikuyama S., Yada T. Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca^{2+} signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* 52 (2003) 948–956.
- Koca S.S., Ozgen M., Aydin S., Dag S., Evren B., Isik A. Ghrelin and obestatin levels in rheumatoid arthritis. *Inflammation* 31 (2008) 329–35.
- Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K. Ghrelin is growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402 (1999) 656–660.
- Kojima M., Hosoda H., Kangawa K. Ghrelin, a novel growth-hormone-releasing and appetite-stimulating peptide from stomach. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 18 (2004) 517–30.
- Kojima M., Hosoda H., Matsuo H., Kangawa K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab* 12 (2001) 118–122.
- Kojima M., Kangawa K. Ghrelin: more than endogenous growth hormone secretagogue. *Ann. N Y Acad Sci* 1200 (2010) 140–148.
- Konturek P., Brzozowski T., Walter B., Burnat G., Hess T., Hahn E. Ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury involves an activation of sensory afferent nerves and hyperemia mediated by nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 536 (2006) 171–81.

- Konturek P.C., Brozowski T., Pajdo R., Nikiforuk A., Kwiecien S., Harsch I., Drozdowicz D., Hahn E.G. Ghrelin – a new gastroprotective factor in gastric mucosa. *J Physiol Pharmacol* 55 (2004) 325–336.
- Koob G.F. Animal models of craving for ethanol. *Addiction* 95 S2 (2000) S73-S81.
- Koob G.F. Neuroadaptive mechanisms of addiction: studies on the extended amygdala. *Eur Neuropsychopharmacol* 13 (2003) 442-452.
- Koob G.F., Roberts A.J., Schulteis G., Parsons L.H., Heyser C.J., Hyytia P., Merlo-Pich E., Weiss F. Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 22 (1998) 3-9.
- Korbonits M., Ciccarelli E., Ghigo E., Grossman A.B. The growth hormone secretagogue receptor. *Growth Horm IGF Res* 9 (1999) 93–99.
- Korbonits M., Goldstone A.P., Gueorguiev M., Grossman A.B. Ghrelin - a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol* 25 (2004) 27–68.
- Kostowski W. i Herman Z.S. *Farmakologia t.II*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL (2003) 227-249.
- Kraus T., Reulbach U., Bayerlein K., Mugele B., Hillemacher T., Sperling W., Kornhuber J., Bleich S. Leptin is associated with craving in females with alcoholism. *Addict Biol* 9 (2004) 213–219.
- Kraus T., Schanze A., Gröschl M., Bayerlein K., Hillemacher T., Reulbach U., Kornhuber J., Bleich S. Ghrelin levels are increased in alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 29 (2005) 2154-7.
- Kristensson E., Sundqvist M., Astin M., Kjerling M., Mattsson H., Dornonville de la Cour C., Håkanson R., Lindström E. Acute psychological stress raises plasma ghrelin in the rat. *Regul Pept* 134 (2006) 114-7.
- Lam M.P., Marinelli P.W., Bai L., Gianoulakis C. Effects of acute ethanol on opioid peptide release in the central amygdala. An in vivo microdialysis study. *Psychopharmacology* 201 (2008) 261–271.
- Landgren S., Jerlhag E., Hallman J., Orelund L., Lissner L., Strandhagen E., Thelle D.S., Zetterberg H., Blennow K., Engel J.A. Genetic variation of the ghrelin signaling system in females with severe alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 34 (2010) 1519-1524.
- Landgren S., Jerlhag E., Zetterberg H., Gonzalez-Quintela A., Campos J., Olofsson U., Nilsson S., Blennow K., Engel J. Association of Pro-Ghrelin and GHS-R1A gene polymorphisms and haplotypes with heavy alcohol use and body mass. *Alcohol Clin Exp Res* 32 (2008) 2054–2061.
- Lawrence A.J., Cowen M.S., Yang H.J., Chen F., Oldfield B. The orexin system regulates alcohol-seeking in rats. *Br J Pharmacol* 148 (2006) 752–759.

Lee H.M., Wang G., Englander E.W., Kojima M. Greeley G.H. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 143 (2002) 185–190.

Lehto-Axtelius D., Chen D., Surve V.V., Hakanson R. Post-gastrectomy osteopenia in the rat: bone structure is preserved by retaining 10–30% of the oxyntic gland area. *Scand J Gastroenterol* 37 (2002) 437-443.

Leibowitz S.F. Overconsumption of dietary fat and alcohol: Mechanisms involving lipids and hypothalamic peptides. *Physiol Behav* 91 (2007) 513–521.

Leibowitz S.F., Avena N.M., Chang G.Q., Karatayev O., Chau D.T, Hoebel B.G. Ethanol intake increases galanin mRNA in the hypothalamus and withdrawal decreases it. *Physiol Behav* 79 (2003) 103–111.

Lenz B., Frieling H., Jacob C., Heberlein A., Kornhuber J., Bleich S., Hillemacher T. The modulating effect of the androgen receptor on craving in alcohol withdrawal of men is partially mediated by leptin. *Pharmacogenomics Journal* 10 (2010) 226-231.

Leonetti F., Silecchia G., Iacobellis G., Ribaudo M.C., Zappaterreno A., Tiberti C., Iannucci C.V., Perrotta N., Bacci V., Basso M.S., Basso N., and Di Mario U. Different plasma ghrelin levels after laparoscopic gastric bypass and adjustable gastric banding in morbid obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (2003) 4227–4231.

Lesch O.M., Kefer J., Lentner S., Mader R., Marx B., Musalek M., Nimmerrichter A., Preinsberger H., Puchinger H. Diagnosis of chronic alcoholism - classificatory problems. *Psychopathology* 23 (1990) 88–96.

Lesch O.M., Riegler A., Gutierrez K., Hertling I., Ramskogler K., Semler B., Zoghiami A., Benda N., Walter H. The European acamprosate trials: Conclusions for research and therapy. *Journal of Biomedical Sciences* 8 (2001) 89-95.

Lesch O.M., Walter H. Subtypes of alcoholism and their role in therapy. *Alcohol Alcohol* S1 (1996) 63–67.

Lewis M.J., Johnson D.F., Waldman D., Leibowitz S.F., Hoebel B.G. Galanin microinjection in the third ventricle increases voluntary ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 28 (2004) 1822–1828.

Li W.G., Gavrila D., Liu X., Wang L., Gunnlaugsson S., Stoll L.L., McCormick M.L., Sigmund C.D., Tang C., Weintraub N.L. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappa B activation in human endothelial cells. *Circulation* 109 (2004) 2221-2226.

Lieber C.S. Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease: progress over the last 50 years. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku*, 50 (2005) 7-20.

Lin R.C., Guthrie S., Xie C.-Y., Mai K., Lee D.Y., Lumeng L., Li T.-K. Isoflavonoid compounds extracted from *Pueraria lobata* suppresses alcohol preference in a pharmacogenetic rat model of alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 20 (1996) 659-663.

- Lopez M., Lage R., Saha A.K., Perez-Tilve D., Vazquez M.J., Varela L., Sangiao-Alvarellos S., Tovar S., Raghay K., Rodriguez-Cuenca S., Deoliveira R.M. Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab* 7 (2008) 389–399.
- Lu S., Guan J.L., Wang Q.P., Uehara K., Yamada S., Goto N., Date Y., Nakazato M., Kojima M., Kangawa K., Shioda S. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 321 (2002) 157–160.
- Lucas S.E., Penetar D., Berko J., Vicens L., Palmer C., Mallya G., Macklin E.A., Lee D.Y. An extract of the Chinese herbal root kudzu reduces alcohol drinking by heavy drinkers in a naturalistic setting. *Alcohol Clin Exp Res* 29 (2005) 756–762.
- Lutter M., Sakata I., Osborne-Lawrence S. The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nature Neuroscience* 11 (2008) 752–753.
- Makovey J., Naganathan V., Seibel M., Sambrook P. Gender differences in plasma ghrelin and its relations to body composition and bone - an opposite-sex twin study. *Clin Endocrinol* 66 (2007) 530–537.
- Malik S., McGlone F., Bedrossian D., Dagher A. Ghrelin modulates brain activity in areas that control appetitive behavior. *Cell Metab* 7 (2008) 400–409.
- Mann K., Kiefer F., Smolka M., Gann H., Wellek S., Heinz A. Searching for responders to acamprosate and naltrexone in alcoholism treatment: rationale and design of the predict study. *Alcohol Clin Exp Res* 33 (2009) 674–683.
- Mann K., Kiefer F., Spanagel R., Littleton J. Acamprosate: recent findings and future research directions. *Alcohol Clin Exp Res* 32 (2008) 1105–1110.
- Marzullo P., Salvadori A., Brunani A., Verti B., Walker G.E., Fanari P., Tovaglieri I., de Medici C.D., Liuzzi A. Acylated ghrelin decreases during acute exercise in the lean and obese state. *Clin Endocrinol* 69 (2008) 970–971.
- Mason B.J. Acamprosate and naltrexone treatment for alcohol dependence: an evidence-based risk-benefits assessment. *Eur Neuropsychopharmacol* 13 (2003) 469–475.
- Mason B.J., Goodman A.M., Chabac S., Lehert P. Effect of oral acamprosate on abstinence in patients with alcohol dependence in a double-blind, placebo-controlled trial: The role of patient motivation. *J Psychiatr Res* 40 (2006) 383–393.
- 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 Biophys Res Commun* 276 (2000) 905–908.
- Matkowski A., Woźniak D., Oszmiański J., Lamer-Zarawska E. Flavonoids of *Pueraria lobata*: chromatographic analysis of leaves and roots of cultivated plants. *Pharmazie* 58 (2003) 682–683.

- Mayfield R.D., Lewohl J.M., Dodd P.R., Herlihy A., Liu J., Harris R.A. Patterns of gene expression are altered in the frontal and motor cortices of human alcoholics. *J Neurochem* 81 (2002) 802–813.
- McBride W.J., Li T.K., Deitrich R.A., Zimatkin S., Smith B.R., Rodd-Henricks Z.A. Involvement of acetaldehyde in alcohol addiction. *Alcohol Clin Exp Res* 26 (2002) 114-119.
- McGregor I.S., Gallate J.E. Rats on the grog: Novel pharmacotherapies for alcohol craving. *Addict. Behav* 29 (2004) 1341-1357.
- McKee K.K., Tan C.P., Palyha O.C., Liu J., Feighner S.D., Hreniuk D.L., Smith R.G., Howard A.D., Van der Ploeg L.H. Cloning and characterization of two human G. protein-coupled receptor genes (GPR38 and GPR39) related to the growth hormone secretagogue and neurotensin receptors. *Genomics* 46 (1997) 426–434.
- Mikołajczak P. Postęp w badaniach nad wykorzystaniem surowców roślinnych w terapii uzależnienia alkoholowego. *Herba Polonica* 52 (2006) 133-145.
- Mikołajczak P., Okulicz-Kozaryn I., Kamińska E., Szczawińska K., Wachowiak R. Some aspects of acetone pharmacokinetics in chronically ethanol treated rats. *Pol J Pharmacol* 46 (1994) 369-370.
- Mikołajczak P., Okulicz-Kozaryn I., Kamińska E., Szulc M., Dyr W., Kostowski W. Lack of ifenprodil anxiolytic activity after its multiple treatment in chronically ethanol treated rats. *Alcohol Alcohol* 38 (2003) 310-315.
- Mikołajczak P., Okulicz-Kozaryn I., Kowalski R., Kamińska E., Szulc M., Bobkiewicz - Kozłowska T., Łowicka A., Mscisz A., Mrozikiewicz P.M. Effect of Pueraria lobata on behavioral functions in chronically ethanol drinking outbred rats. The 15th World Congress of Pharmacology (IUPHAR-2006), Beijing, China, July 2-7, 2006. *Acta Pharmacologica Sinica* 27 (2006) 421-421.
- Mikołajczak P., Okulicz-Kozaryn I., Szczawińska K., Kamińska E., Kus K. Zolpidem in involvement on memory in hypnotic effects of ethanol in chronically ethanol-treated rats. *Alcohol Alcohol* 34 (1999) 511-519.
- Mikołajczak P., Szulc M., Okulicz-Kozaryn I., Kamińska E., Wiktorowicz K., Leśniewska K., Bobkiewicz-Kozłowska T. Effect of acamprosate on plasma and cerebrospinal fluid leptin levels in chronically ethanol drinking outbred rats. XVth International Congress of the Polish Pharmacological Society, Poznań, September 12-14, 2004. *Pol J Pharmacol* 56 (2004) 76.
- Mikołajczak P., Wiktorowicz K., Olkusz-Kozaryn I., Kostrzewa A., Kamińska E. Analysis of the distribution of peripheral blood lymphocyte subsets associated with chronic ethanol treatment in rats with a disturbed circadian cycle. *Drug Alcohol Depend* 60 (2000) 303-309.
- Mikołajczak P., Mrozikiewicz P.M., Mścisz A., Bobkiewicz-Kozłowska T. Mechanizmy przeciwalkoholowego działania wyciągu z korzenia Pueraria lobata (kudzu). *Współczesne poglądy. Herba Polonica* 55 (2009) 78-87.

- Mikołajczak P., Okulicz-Kozaryn I., Gołyś K., Moryson E., Kamińska E., Szulc M., Mścisz A., Bobkiewicz-Kozłowska T., Mrozikiewicz P.M. Effects of daidzin and puerarin on behavioral and cognitive functions in chronically ethanol drinking outbred rats. Polish Neuroscience Society, 9th International Congress, September 9-12, 2009, Warszawa. *Acta Neurobiol Exp* 69 (2009) 351.
- Mitchell V., Bouret S., Beauvillain JC, Schilling A., Perret M, Kordon C. Comparative distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R.) in *Microcebus murinus* (primate, lemurian) and rat forebrain and pituitary. *J Comp Neurol* 429 (2001) 469–489.
- 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. *FEBS Lett.* 486 (2000) 213–216.
- Moscato B.S., Russell M., Zielezny M., Bromet E., Egri G., Mudar P., Marshall J.R. Gender differences in the relation between depressive symptoms and alcohol problems: a longitudinal perspective. *Am J Epidemiol* 146 (1997) 966–974.
- Muccioli G., Tschop M., Papotti M., Deghenghi R., Heiman M., Ghigo E. Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol* 440 (2002) 235–254.
- Muller E.E., Locatelli V., Cocchi D. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev* 79 (1999) 511–607.
- Murashita M., Kusumi I., Hosoda H., Kangawa K., Koyama T. Acute administration of clozapine concurrently increases blood glucose and circulating plasma ghrelin levels in rats. *Psychoneuroendocrinology* 32 (2007) 777–84.
- Murakami N., Hayashida T., Kuroiwa T., Nakahara K., Ida T., Mondal MS, Nakazato M., Kojima M., Kangawa K. Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats *J Endocrinol* 174 (2002) 283–288.
- Nagaya N., Uematsu M., Kojima M., Date Y., Nakazato M., Okumura H., Hosoda H., Shimizu W., Yamagishi M., Oya H., Koh H., Yutani C., Kangawa K. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors, *Circulation* 104 (2001) 2034–2038.
- 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* 409 (2001) 194–198.
- Nedvikova J., Krykorkova I., Bartak V., Papezova H., Gold P.W., Alesci S., Pacak K. Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (2003) 1678–1682.

- Nicholls R.D., Knepper J.L. Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2 (2001) 153–175.
- Nicolas J. M., Fernandez-Sola J., Fatjo F., Casamitjana R., Battaler R., Sacanella E., Tobias E., Badia E., Estruch R. Increased circulating leptin levels in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 25 (2001) 83–88.
- Niemelä O., Alatalo P. Biomarkers of alcohol consumption and related liver disease. *Scand J Clin Lab Invest* 70 (2010) 305–12.
- Nikolopoulos D., Theocharis S., Kouraklis G. Ghrelin, another factor affecting bone metabolism. *Med Sci Monit* 16 (2010a) 147–162.
- Nikolopoulos D., Theocharis S., Kouraklis G. Ghrelin: A. potential therapeutic target for cancer. *Regul Pept* 163 (2010b) 7–17.
- Nishi Y., Hiejima H., Hosoda H. Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. *Endocrinology* 146 (2005) 2255–64.
- Norsted E., Gomuc B., Meister B. Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the mediobasal hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 36 (2008) 107–121.
- Ochi M., Tominaga K., Tanaka K. Effect of chronic stress on gastric emptying and plasma ghrelin levels in rats. *Life Sci* 82 (2008) 862–868.
- Okulicz-Kozaryn I., Mikołajczak P., Kamińska E.: Tolerance to hypothermia and hypnotic action of ethanol in 3 and 14 months old rats. *Pharmacol Res* 25 (1992) S63-S64.
- Olsen R.W. Extrasynaptic GABA-A receptors in the nucleus accumbens are necessary for alcohol drinking. *PNAS* 108 (2011) 4699–4700.
- Olszewski P.K., Schiöth H.B., Levine A.S. Ghrelin in the CNS: From hunger to a rewarding and memorable meal? *Brain Res Rev* 58 (2008) 160–170.
- Otero M., Nogueiras R., Lago F., Dieguez C., Gomez-Reino J., Gualillo O. Chronic inflammation modulates ghrelin levels in humans and rats. *Rheumatology* 43 (2004) 306–310.
- Otto B., Cuntz U., Fruehauf E., Wawarta R., Folwaczny C., Riepl R.L., Heiman M.L., Lehnert P., Fichter M., Tschop M. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 145 (2001) 669–673.
- Overstreet D.H., Knapp D.J., Breese G.R. Modulation of multiple ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior by CRF and CRF1 receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 77 (2004) 405–413.

- Overstreet D.H., Kralic J.E., Morrow A.L., Ma Z.Z., Zhang Y.W., Lee D.Y.W. NPI-031G (puerarin) reduces anxiogenic effects of alcohol withdrawal or beznodiazepine inverse or 5-HT_{2C} agonists. *Pharmacol Biochem Behav* 75 (2003) 619-625.
- Overstreet D.H., Lee Y.W., Chen Y.T., Rezvani A.H. The Chinese herbal medicine NPI-028 suppresses alcohol intake in alcohol-preferring rats and monkeys without inducing taste aversion. *Perfusion* 11 (1998) 381-390.
- Overstreet D.H., Lee Y.W., Rezvani A.H., Pei Y.H., Criswell H.E., Janowsky D.E. Suppression of alcohol intake after administration of the Chinese herbal medicine, NPI-028, and its derivatives. *Alcohol Clin Exp Res* 20 (1996) 221-227.
- Palik E., Birkas K.D., Faludi G., Karadi I., Cseh K. Correlation of serum ghrelin levels with body mass index and carbohydrate metabolism in patients treated with atypical antipsychotics. *Diabetes Res Clin Pract* 68 (2005) S60-S64.
- Penetar D.M., MacLean R.R., McNeil J.F., Lukas S.E. Kudzu extract treatment does not increase the intoxicating effects of acute alcohol in human volunteers. *Alcohol Clin Exp Res* 35 (2011) 726-734.
- Perboni S., Inui A. Appetite and gastrointestinal motility: Role of ghrelin-family peptides. *Clin Nutr* 29 (2010) 227-234.
- Pich E.M., Lorang M., Yeganeh M., De Fonseca F.R., Raber J., Koob G.F., Weiss F. Increase of extracellular Corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdale of awake rats during restrain stress and ethanol withdrawal as measured by microdialysis. *J Neurosci* 15 (1995) 5439-5447.
- Pierrefiche O., Daoust M., Naassila M. Biphasic effect of acamprosate on NMDA but not on GABA_A receptors in spontaneous rhythmic activity from the isolated neonatal rat respiratory network. *Neuropharmacology* 47 (2004) 35-45.
- Poddar M.K., Bandyopadhyay B.C., Chakrabarti L. Dietary protein alters age-induced changes in hypothalamic GABA and immune response. *Neuroscience* 97 (2000) 405-409.
- Polińska B., Matowicka-Karna J., Kemona H. Rola greliny w organizmie *Postepy Hig Med Dosw* 65 (2011) 1-7.
- Pombo S., Lesch O.M. The alcoholic phenotypes among different multidimensional typologies: similarities and their classification procedures. *Alcohol Alcohol* 44 (2009) 46-54.
- Pong S.S., Chaung L.Y., Dean D.C., Nargund R.P., Patchett A.A., Smith R.G. Identification of a new G-protein-linked receptor for growth hormone secretagogues. *Mol Endocrinol* 10 (1996) 57-61.
- Popp R.L., Erickson C.K. The effect of an acute ethanol exposure on the rat brain POMC opiopeptide system. *Alcohol* 16 (1998) 139-148.

- Poppit S.D., Eckhart J.W., McGanogle J., Murgatroyd P.R., Prentice A.M. Short-term effect of alcohol consumption on appetite and energy intake. *Physiol Behav* 60 (1999) 1063–1070.
- Prado C., Pugh-Bernard A.E., Elghazi L., Sosa-Pineda B., Sussel L. Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004) 2924–2929.
- Rada P., Avena N.M., Leibowitz S.F., Hoebel B.G. Ethanol intake is increased by injection of galanin in the paraventricular nucleus and reduced by a galanin antagonist. *Alcohol* 33 (2004) 91–97.
- Rak A., Gregoraszczyk E. Ghrelin levels in prepubertal pig ovarian follicles. *Acta Vet Hung* 57 (2009a) 109–113.
- Rak A., Szczepankiewicz D., Gregoraszczyk E. Expression of ghrelin receptor, GHSR-1a, and its functional role in the porcine ovarian follicles. *Growth Horm. IGF Res* 19 (2009b) 68–76.
- Reinehr T., de Sousa G., Roth C.L. Obestatin and ghrelin levels in obese children and adolescents before and after reduction of overweight. *Clin Endocrinol* 68 (2008) 304-10.
- Rezvani A.H., Overstreet D.H., Perfumi M., Massi M. Plant derivatives in the treatment of alcohol dependency. *Pharmacol Biochem Behav* 75 (2003) 593-606.
- Rigamonti A., Pincelli A.I., Corra B., Viarengo R., Bonomo S.M., Galimberti D., Scacchi M., Scarpini E., Cavagnini F., Muller E.E. Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *J Endocrinol* 175 (2002) R1–R5.
- Robinson I.C. Hypothalamic targets for growth hormone secretagogues. *Acta Paediatr Suppl* 423 (1997) 88–91.
- Rouach V., Bloch M., Rosenberg N., Gilad S., Limor R., Stern N., Greenman Y. The acute ghrelin response to a psychological stress challenge does not predict the poststress urge to eat. *Psychoneuroendocrinology*, 32 (2007) 693–702.
- Roy A., Pandey S.C. The decreased cellular expression of neuropeptide Y protein in rat brain structures during ethanol withdrawal after chronic ethanol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 26 (2002) 796–803.
- Rudzińska U., Zalewska-Kaszybska J., Rola endogennych neuropeptydów w patomechanizmie uzależnienia alkoholowego. *Postepy Hig Med Dosw* 63 (2009) 643-652.
- Sakata I., Yamazaki M., Inoue K., Hayashi Y., Kangawa K., Sakai T. Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion. *Neurosci Lett* 342 (2003) 183–186.
- Samson H.H. The microstructure of ethanol drinking: genetic and behavioral factors in the control of drinking patterns. *Addiction* 95 S2 (2000) S61-S72.

- Sanchis-Segura C., Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addiction Biology* 11 (2006) 2-38.
- Schneider E., Rada P., Darby R.D., Leibowitz S., Hoebel B. Orexigenic Peptides and Alcohol Intake: Differential Effects of Orexin, Galanin, and Ghrelin. *Alcohol Clin Exp Res* 31 (2007) 1858-65.
- Schuckit M.A. Alcohol-use disorders. *Lancet* 373 (2009) 492–501.
- Seńczuk W. Toksykologia. Wydawnictwo Lekarskie PZWL (2002) 403-414.
- Shebek J., Rindone J.P. A pilot study exploring the effect of kudzu root on the drinking habits of patients with chronic alcoholism. *The journal of alternative and complementary medicine* 1 (2000) 45-48.
- Shiia 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* 87 (2002) 240–244.
- Shimizu Y., Nagaya N., Isobe T., Imazu M., Okumura H., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K., Kohno N. Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res* 9 (2003) 774–778.
- Shintani M., Ogawa Y., Ebihara K., Aizawa-Abe M., Miyanaga F., Takaya K., Hayashi T., Inoue G., Hosoda K., Kojima M., Kangawa K., Nakao K. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50 (2001) 227–232.
- Sibilia V., Rindi G., Pagani F., Rapetti D., Locatelli V., Torsello A., Campanini N., Deghenghi R., Netti C. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanism of action. *Endocrinology* 144 (2003) 353–359.
- Sinclair J.D. Evidence about the use of naltrexone and for different ways of using it in the treatment of alcoholism. *Alcohol Alcohol* 36 (2001) 2-10.
- Smith R.G., Feighner S., Prendergast K., Guan X., and Howard A. A new orphan receptor involved in pulsatile growth hormone release. *Trends Endocrinol Metab* 10 (1999a) 128–135.
- Smith R.G., Palyha O.C., Feighner S.D., Tan C.P., McKee K.K., Hreniuk D.L., Yang L., Morriello G., Nargund R., Patchett A.A., Howard A.D. Growth hormone releasing substances: types and their receptors. *Horm Res* 51 (1999b) 1–8.
- Smith R.G., Pong S.S., Hickey G., Jacks T., Cheng K., Leonard R., Cohen C.J., Arena J.P., Chang C.H., Drisko J., Wyvrat M., Fisher M., Nargund R., Patchett A. Modulation of pulsatile GH release through a novel receptor in hypothalamus and pituitary gland. *Recent Prog Horm Res* 51 (1996) 261–285.

- Smith R.G., Van der Ploeg L.H., Howard A.D., Feighner S.D., Cheng K., Hickey G.J., Wyvrat M.J. Jr., Fisher M.H., Nargund R.P., Patchett A.A. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 18 (1997) 621–645.
- Soares J.B., Leite-Moreira A.F. Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: three pieces of the same puzzle. *Peptides* 29 (2008) 1255-1270.
- Soyka M., Kranzler H.R., Berglund M., Gorelick D., Hesselbrock V., Johnson B.A., Moller H.J., The WFSBP Task Force On Treatment Guidelines For Substance Use Disorders. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for Biological Treatment of Substance Use and Related Disorders, Part 1: Alcoholism. *The World Journal of Biological Psychiatry* 9 (2008) 6-23.
- Spanagel R. Alcohol addiction research: from animal models to clinics. *Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology* 17 (2003) 507-518.
- Spanagel R., Kiefer F. Drugs for relapse prevention of alcoholism: ten years of Progress. *Trends Pharmacol Sci* 29 (2008) 109-115.
- Spence J.P., Liang T., Habegger K., Carr L.G. Effect of polymorphism on expression of the neuropeptide Y gene in inbred alcohol-preferring and nonpreferring rats. *Neuroscience* 131 (2005) 871–876.
- Spiegel K., Tasali E., Leproult R., Scherberg N., Van Cauter E. Twenty-four-hour profiles of acylated and total ghrelin: relationship with glucose levels and impact of time of day and sleep. *J Clin Endocrinol Metab* 96 (2011) 486-93.
- Suzuki K., Simpson K.A., Minnion J.S., Shillito J.C., Bloom S.R. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocr J* 57 (2010) 359–372.
- Svensson J., Lall S., Dickson S.L., Bengtsson B.A., Romer J., Ahnfelt-Ronne I., Ohlsson C., Jansson J.O. Effects of growth hormone and its secretagogues on bone. *Endocrine* 14 (2001) 63–66.
- Swift R. Direct measurement of alcohol and its metabolites. *Addict* 98 S2 (2003) 73–80.
- Szulc M., Mikołajczak P., Okulicz-Kozaryn I., Kamińska E., Dyr W., Kostowski W. Acamprosate effect on short-term memory in chronically ethanol treated rats. *Pol J Pharmacol* 54 (2002) 539-540.
- Szulc M., Mikołajczak P.L., Okulicz-Kozaryn I., Kamińska E., Bobkiewicz-Kozłowska T. Acute systemic ghrelin administration induces anxiolytic behaviour and memory enhancement in rats. 7th Meeting of the German Neuroscience Society, Gottingen, 29 March - 1 April (2007) Abstracts, T9-2C.
- Tambour S., Quertemont E. Preclinical and clinical pharmacology of alcohol dependence. *FCP* 21 (2007) 9–28.
- 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 Psychiatr Res* 37 (2003a) 17–22.

- 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* 28 (2003b) 829–835.
- Tena-Sempere M., Barreiro M.L., Gonzalez L.C., Gaytan F., Zhang F.P., Caminos J.E., Pinilla L., Casanueva F.F., Dieguez C., Aguilar E. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 143 (2002) 717–725.
- Thiele T.E., Marsh D.J., Ste Marie L., Brenstein I.L., Palmiter R.D. Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. *Nature* 396 (1998) 366–369.
- Thiele T.E., Navarro M., Sparta D.R., Fee J.R., Knapp D., Cubero I. Alcoholism and obesity: overlapping neuropeptide pathways? *Neuropeptide* 37 (2003) 321–327.
- Thorner M.O., Chapman I.M., Gaylinn B.D., Pezzoli S.S., Hartman M.L. Growth hormone-releasing hormone and growth hormone-releasing peptide as therapeutic agents to enhance growth hormone secretion in disease and aging. *Recent Prog Horm Res* 52 (1997) 215–244.
- Toshinai K., Mondal M.S., Nakazato M., Date Y., Murakami N., Kojima M., Kangawa K., Matsukura S. Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun* 281 (2001) 1220–1225.
- Toshinai K., Yamaguchi H., Sun Y., Smith R.G., Yamanaka A., Sakurai T. Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 147 (2006) 2306–2314.
- Toth K., Laszlo K., Lukacs E., Lenard L., Intraamygdaloid microinjection of acylated-ghrelin influences passive avoidance learning. *Behav Brain Res* 202 (2009) 308–311.
- Tovey F.I., Hall M.L., Ell P.J., Hobsley M.A. review of postgastrectomy bone disease. *J. Gastroenterol Hepatol* 7 (1992) 639–645.
- Trudel L., Tomasetto C., Rio M.C., 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* 282 (2002) G948–G952.
- Tschop M., Smiley D.L., Heiman M.L. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407 (2000) 908–913.
- Tschop M., Wawarta R., Riepl R.L., Friedrich S., Bidlingmaier M., Landgraf R., Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 24 (2001a) 19–21.
- Tschop M., Weyer C., Tataranni P.A., Devanarayan V., Ravussin E., Heiman M.L. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50 (2001b) 707–709.

- Tupala E., Tiihonen J. Dopamine and alcoholism: neurobiological basis of ethanol abuse. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28 (2004) 1221–1247.
- Ueberberg B., Unger N., Saeger W., Mann K., Petersenn S. Expression of ghrelin and its receptor in human tissues. *Horm Metab Res* 41 (2009) 814-821.
- Van den Bree M.B., Johnson E.O., Neale M.C., Pickens R.W. Genetic and environmental influences on drug use and abuse/dependence in male and female twins. *Drug Alcohol Depend* 52 (1998) 231–241.
- Vescovi P.P., Coiro V., Volpi R., Giannini A., Passeri M. Plasma β -endorphin, but not met-enkephalin levels are abnormal in chronic alcoholics. *Alcohol Alcohol* 27 (1992) 471–475.
- Vicennati 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* 157 (2007) 295–301.
- 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* 87 (2002a) 1300–1308.
- Volante M., Fulcheri E., Allia E., Cerrato M., Pucci A., Papotti M. Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung. *J Histochem Cytochem* 50 (2002b) 1013–1021.
- Volkow N.D., Fowler J.S., Wang G.J. Role of dopamine in drug reinforcement and addiction in humans: results from imaging studies. *Behav Pharmacol* 13 (2002) 355–366.
- Volkow N.D., Wang G.J., Maynard L., Jayne M., Fowler J.S., Zhu W., Logan J., Gatley S.J., Ding Y.S., Wong C., Pappas N. Brain dopamine is associated with eating behaviors in humans. *Int J Eat Disord* 33 (2003) 136–142.
- Wachowiak R., Przybylski Z., Straub T. Simultaneous chromatographic analysis of ethyl alcohol and other volatile poisons in biological material. *Archiwa Medycyny Sądowej i Kryminalistyki* 40 (1990) 91-97.
- Wasilewski D., Habrat B., Grobel I. Praktyczne aspekty farmakologicznego leczenia uzależnienia od alkoholu. *Alkoholizm i Narkomania* 13 (2000) 433-457.
- Weikel J., Wichniak A., Ising M., Brunner H., Friess E., Held K. Ghrelin promotes slow-wave sleep in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284 (2003) 407–15.
- Wellman P.J., Davis K.W., Nation J.R. Augmentation of cocaine hyperactivity in rats by systemic ghrelin. *Regul Pept* 125 (2005) 151–154.
- Westerterp-Plantenga M.S., Verwgen C.R.T. The appetizing effect of an aperitif in overweight and normal weight humans. *Am J Clin Nutr* 69 (1999) 205–212.

- Whitworth A.B, Fischer F., Lesch O.M., Nimmerrichter A., Oberbauer H., Platz T., Potgieter A., Walter H., Fleischhacker W.W. Comparison of acamprosate and placebo in long-term treatment of alcohol dependence. *Lancet* 347 (1996) 1438-1442.
- Wilding J.P.H. Neuropeptides and appetite control. *Diabet Med* 19 (2002) 619–627.
- Wilkinson C.W., Crabbe J.C., Keith L.D., Kendall J.W., Dorsa D.M. Influence of ethanol dependence on regional brain content of beta-endorphin in the mouse. *Brain Res* 16 (1986) 107–114.
- Willesen M.G., Kristensen P., Romer J. Co-localization of GH secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70 (1999) 306–316.
- Williams D.L., Grill H.J., Cummings D.E., Kaplan J.M. Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology* 144 (2003) 5184–5187.
- Williams K.L., Woods J.H., Naltrexone reduces ethanol- and/or water-reinforced responding in rhesus monkeys: effect depends upon ethanol concentration. *Alcohol Clin Exp Res* 23 (1999) 1462-1467.
- Wing M.K., Vallee B.L. Kudzu root: an ancient chinese source of modern antidipsotropic agents. *Phytochemistry* 47 (1998) 499-506.
- Wójsiak Z., Okulicz-Kozaryn I., Mikołajczak P., Jawień W. Influence of chlorpromazine on pharmacokinetics of ethanol in rats. *Mem Pharm* 1 (1990) 9-17.
- Wortley K.E., Anderson K., Garcia K., Murray J., Malinova L., Liu R., Moncrieffe M., Thabet K., Cox H., Yancopoulos G.D., Wiegand S.J., Sleeman M.W. Deletion of ghrelin reveals no effect on food intake, but a primary role in energy balance. *Obesity Res* 12 (2004a) 170.
- Wortley K.E., Anderson K.D., Garcia K., Murray J.D., Malinova L., Liu R., Moncrieffe M., Thabet K., Cox H.J., Yancopoulos G.D., Wiegand S.J., Sleeman M.W. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004b) 8227–8232.
- Wren A.M., Seal L.J., Cohen M.A., Brynes A.E., Frost G.S., Murphy K.G., Dhillon W.S., Ghatei M.A., and Bloom S.R. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86 (2001a) 5992.
- Wren A.M., Small C.J., Abbott C.R., Dhillon W.S., Seal L.J., Cohen M.A., Batterham R.L., Taheri S., Stanley S.A., Ghatei M.A., and Bloom S.R. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50 (2001b) 2540–2547.
- Wurst F., Bechtel G., Forster S., Wolfersdorf M., Huber P., Scholer A., Pridzun L., Alt A., Seidl S., Dierkes J., Dammann G. Leptin levels of alcohol abstainers and detoxification patients are not different. *Alcohol Alcohol* 38 (2003) 364-368.

- Wurst F.M., Graf I., Ehrenthal H.D., Klein S., Backhaus J., Blank S., Graf M., Pridzun L., Wiesbeck G.A., Junghanns K. Gender differences for ghrelin levels in alcohol-dependent patients and differences between alcoholics and healthy controls. *Alcohol Clin Exp Res* 31 (2007) 2006-11.
- Xie C.-I., Lin R.C., Antony V., Lumeng L., Li T.-K., Mai K. Daidzin decreases blood alcohol levels and shortens sleep time induced by ethanol intoxication. *Alcohol Clin Exp Res* 18 (1994) 1443-1447.
- Xu X., Jhun B.S., Ha C.H., Jin Z.G. Molecular mechanisms of ghrelin-mediated endothelial nitric oxide synthase activation, *Endocrinology* 149 (2008) 4183-4192.
- Yada T., Kaiya H., Mutoh K., Azuma T., Hyodo S., Kangawa K. Ghrelin stimulates phagocytosis and superoxide production in fish leukocytes. *J Endocrinol* 189 (2006) 57-65.
- Yang J., Brown M., Liang G., Grishin N., Goldstein J. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132 (2008a) 387-396.
- Yang J., Zhao T., Goldstein J.L., Brown M.S. Inhibition of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) by octanoylated pentapeptides. *Proc Natl Acad Sci* 142 (2008b) 10750-10755
- Yeomans M.R., Caton S., Hetherington M.M. Alcohol and food intake. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 6 (2003) 639-644.
- Yildiz B.O., Suchard M.A., Wong M.L., McCann S.M., Licinio J. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (2004) 10434-10439.
- Yoshihara F., Kojima M., Hosoda H., Nakazato M., Kangawa K. Ghrelin: a novel peptide for growth hormone release and feeding regulation. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 5 (2002) 391-5.
- 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* 13 (2002) 2748-2752.
- Zalewska-Kaszubska J., Ćwiek W., Dyr. W., Czarnecka E. Changes in the beta-endorphin plasma levels after repeated treatment with acamprosate in rats selectively bred for high and low alcohol preference. *Neurosci Lett* 388 (2005) 45-48.
- Zalewska-Kaszubska J., Górska D., Dyr. W., Czarnecka E. Effect of chronic acamprosate treatment on voluntary alcohol intake and β -endorphin plasma levels in rats selectively bred for high alcohol preference. *Neurosci Lett* 431 (2008a) 221-225.
- Zalewska-Kaszubska J., Górska D., Dyr. W., Czarnecka E. Effect of acute administration of ethanol on β -endorphin plasma level in ethanol preferring and non-preferring rats chronically treated with naltrexone. *Pharmacol Biochem Behav* 85 (2006) 155-159.

- Zalewska-Kaszubska J., Górska D., Dyr. W., Czarnecka E. Effect of repeated treatment with topiramate on the beta-endorphin plasma level In rats selectively bred for high and low alcohol preference. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31 (2007) 525–528.
- Zalewska-Kaszubska J., Górska D., Dyr. W., Czarnecka E. Voluntary alcohol consumption and plasma beta-endorphin levels in alcohol-preferring rats chronically treated with naltrexone. *Physiol Behav* 93 (2008b) 1005–1010.
- Zhang C., Yamada N., Wu Y.L., Wen M., Matsuhisa T., Matsukura N. Comparison of *Helicobacter pylori* infection and gastric mucosal histological features of gastric ulcer patients with chronic gastritis patients. *World J Gastroenterol* 11 (2005) 976–81.
- Zhang W., Lin T.R., Hu Y., Fan Y., Zhao L., Stuenkel E.L., Mulholland M.W. Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Physiol* 559 (2004) 729–737.
- Zigman J.M., Elmquist J.K. Minireview: from anorexia to obesity—the yin and yang of body weight control. *Endocrinology* 144 (2003) 3749–3756.
- Zigman J.M., Jones J.E., Lee C.E., Saper C.B., Elmquist J.K. (2006): Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol* 494 (2006) 528–548.
- Zimmermann U.S., Buchmann A., Steffin B., Dieterle C., Uhr M. Alcohol administration acutely inhibits ghrelin secretion in an experiment involving psychosocial stress. *Addict Biol* 12 (2007) 17–21.