

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Jakub Kenig

**Stężenie greliny w surowicy krwi u osób zdrowych
oraz pacjentów z rakiem jelita grubego**

Praca doktorska

Promotor: Prof. dr hab. med. Roman M. Herman

Pracę wykonano w III Katedrze Chirurgii Ogólnej,
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Kierownik jednostki: Prof. dr hab. med. Roman M. Herman

Kraków, 2008

Promotorowi pracy,
Panu Prof. dr hab. med. Romanowi M. Hermanowi
składam serdeczne podziękowania za opiekę
merytoryczną oraz pomoc przy wykonaniu pracy.

I. SKRÓTY UŻYTE W TEKŚCIE	2
II. WSTĘP	4
RAK JELITA GRUBEGO	4
HISTORIA ODKRYCIA GRELINY	5
STRUKTURA GRELINY	7
POWSTAWANIE GRELINY	10
MIEJSCA PRODUKCJI GRELINY	12
RECEPTOR GRELINOWY	14
REGULACJA WYDZIELANIA	17
FIZJOLOGICZNE FUNKCJE GRELINY	22
1. STYMULACJA WYDZIELANIA HORMONU WZROSTU	22
2. REGULACJA APETYTU	23
3. FUNKCJA W PRZEWODZIE POKARMOWYM	26
4. FUNKCJA W UKŁADZIE IMMUNOLOGICZNYM.....	28
5. GRELINA A TKANKA TŁUSZCZOWA	29
6. ODDZIAŁYWANIE GRELINA-LEPTYNA.....	30
7. ORGANIZM POZBAWIONY GRELINY	30
REGULACJA WYDZIELANIA GRELINY W CHOROBIĘ	33
1. GRELINA A OTYŁOŚĆ	33
2. GRELINA W RÓŻNYCH CHOROBYCH GÓRNEGO ODCINKA PRZEWODU POKARMOWEGO.....	34
3. GRELINA A CHOROBY ZAPALNE JELIT	34
4. GRELINA A INNE CHOROBY	35
GRELINA A NOWOTWORY	36
GRELINA A PATOGENEZA RAKA JELITA GRUBEGO	38
III. ZAŁOŻENIA PRACY; HIPOTEZA BADAWCZA	44
IV. CEL PRACY	46
V. MATERIAŁ I METODYKA PRACY	47
MATERIAŁ.....	47
METODYKA PRACY	50
VI. ANALIZA STATYSTYCZNA	54
VII. WYNIKI	55
VIII. DYSKUSJA	91
IX. WNIOSKI	103
X. STRESZCZENIE	104
XI. ABSTRACT	108
XII. SPIS ILUSTRACJI	112
XIII. SPIS TABEL	115
XIV. BIBLIOGRAFIA	117

I. SKRÓTY UŻYTE W TEKŚCIE

AGRP	Agouti-related protein (Białko agouti)
AMPK	AMP-activated protein kinase (Kinaza białkowa aktywowana AMP)
AUC	Area under the curve (Pole pod krzywą)
CART	Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (Transkrypt regulowany kokainą i amfetaminą)
CCK	Cholecystokinin (Cholecystokinina)
CRH	Corticotrophin-releasing hormone (Hormon uwalniający kortykotropinę)
DAG	Diacylglycerol (Diacyloglicerol)
GHRH	Growth hormone releasing hormone (Hormon wydzielający hormon wzrostu)
GHRH-R	Growth hormone releasing hormone receptor (Receptor hormonu wydzielającego hormon wzrostu)
GHRP-6	Growth hormone releasing peptide 6 (Peptyd uwalniający hormon wzrostu 6)
GHS-R	Growth hormone secretagogues receptor (Receptor dla związków pobudzających wydzielanie hormonu wzrostu)
GHS	Growth hormone secretagogues (Związki pobudzające wydzielanie hormonu wzrostu)
GPCR	G protein-coupled receptor (Receptor wiążący się z białkiem G)
HDL	High-density lipoprotein (Lipoproteina o wysokiej gęstości)
IGF-I	Insulin-like growth factor I (Insulinopodobny czynnik wzrostu)
IKK β	Competitive kinase inhibitor beta (Kompetycyjny inhibitor kinazy beta)
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate (Inozytolo 1,4,5-fosforan)
LH	Luteinizing hormone

	(Hormon luteinizujący)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (Kinaza aktywowana mitogenem)
MMC	Migrating motor complex (Wędrujący kompleks motoryczny)
NPY	Neuropeptide Y (Neuropeptyd Y)
PAI-I	Plasminogen activator inhibitor type-I (Inhibitor aktywatora plazminogenu typ I)
PPAR	Peroxisomal proliferator-activated receptors (Receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów)
POMC	Proopiomelanocortin (Proopiomelanokortyna)
RIA	Radio Immuno Assay (Badanie radioimmunologiczne)
ROC	Receiver Operating Characteristic (curve) (Krzywa charakterystyki roboczej odbiorcy)
TEM	Transanal Endoscopic Microsurgery (Przezodbytnicza endoskopowa mikrochirurgia)
TGFbeta1	Transforming growth factor beta1 (Transformujący czynnik wzrostu beta1)
TNFalfa	Tumor necrosis factor alfa (Czynnik martwicy nowotworu alfa)

II. WSTĘP

RAK JELITA GRUBEGO

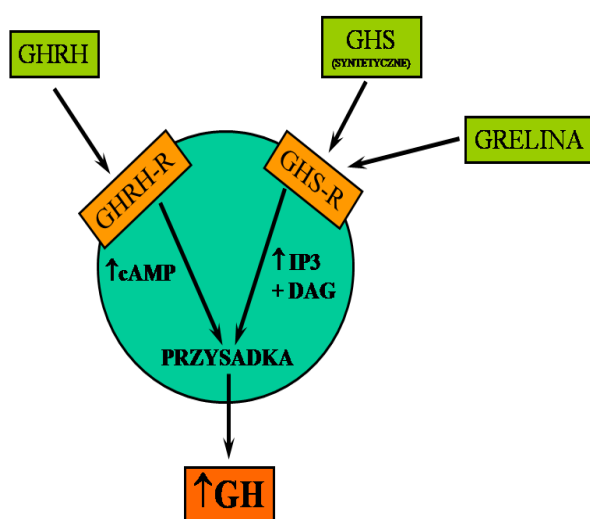
Rak jelita grubego (RJG) jest jednym z najczęstszych nowotworów występujących w populacji ludzkiej. Zajmuje on obecnie drugie miejsce u obu płci (mężczyźni - 10,4%, kobiety - 10,3%), a zachorowalność na raka jelita grubego systematycznie wzrasta. Utrzymująca się tendencja wzrostowa wynosi około 3,5% rocznie w grupie mężczyzn oraz około 2,5% w grupie kobiet. Według danych pochodzących z Krajowego Rejestru Nowotworów, prowadzonego przez Centrum Onkologii w Warszawie, zachorowalność na raka jelita grubego w 2000 roku wyniosła 5837 zachorowań w grupie mężczyzn oraz 5291 w grupie kobiet. W tym samym czasie z powodu nowotworów jelita grubego zmarło 4373 mężczyzn oraz 4144 kobiet.

Wśród czynników wpływających na ryzyko zachorowania na raka jelita grubego można wyróżnić czynniki epidemiologiczne (wiek, masę ciała, rasę, uwarunkowania rodzinne itp.), jelitowe (obecność polipów gruczolakowych, stany zapalne jelit), dietetyczne (zwiększona zawartość tłuszczów w diecie, zmniejszenie ilości błonnika, alkohol itp.) oraz czynniki mieszane. Nadal poszukuje się czynników, które połączyłyby te wszystkie ogniwa w logiczną całość.

HISTORIA ODKRYCIA GRELINY

Zanim doszło do odkrycia greliny naukowcom najpierw udało się otrzymać syntetyczny ligand dla receptora grelinowego, następnie zidentyfikowano sam receptor, a na samym końcu udało się wyizolować naturalny ligand dla tego receptora – grelinę.

W 1976 roku Bowers i wsp. zauważyli, że pewne pochodne opioidów nie wykazują działania opioidowego, ale w bardzo słabym stopniu stymulują wydzielanie hormonu wzrostu. Molekuły te nazwano substancjami stymulującymi wydzielanie hormonu wzrostu (GHS – growth hormone secretagogues). Działanie to obserwowano jedynie *in vitro*, dlatego też rozpoczęto poszukiwania substancji o silniejszym działaniu [1,2]. W 1984 zsyntezowano białko GHRP-6 (growth hormone releasing peptide 6), które stymulowało wydzielanie hormonu wzrostu zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [3]. Niespełna 10 lat później, w 1993 roku, RG Smith i wsp. zsyntezowali pierwszą niebiałkową substancję wykazującą podobne działanie do GHS: L-692.42. Substancja ta zachowywała swoje właściwości nawet po doustnym podaniu [4,5]. Badania nad mechanizmem pobudzania przez te substancje wydzielania hormonu wzrostu doprowadziły do odkrycia alternatywnej drogi stymulacji, innej niż dotąd poznana droga oddziaływania na receptor GHRH-R (growth hormone releasing hormone receptor) poprzez hormon uwalniający hormon wzrostu (GHRH – growth hormone releasing hormone). W odróżnieniu od GHRH-R, którego drugim przekaźnikiem



Rysunek 1. Drogi stymulacji wydzielania hormonu wzrostu.

jest cAMP, nowo poznane substancje działają przez swoisty receptor nazwany GHS-R (growth hormone secretagogues receptor), którego drugim przekaźnikiem jest IP₃ (ang. inositol 1,4,5-triphosphate – inozytolo 1,4,5-fosforan) oraz DAG (ang. diacyloglicerol – diacyloglicerol). Z kolei IP₃ indukuje otwarcie kanałów wapniowych doprowadzając do

wzrostu wewnątrzkomórkowego wapnia (Rysunek 1) [6,7,8,9,10]. W 1996 roku, wykorzystując metody klonowania, udało się dopiero zidentyfikować GHS-R [11]. Był to klasyczny typ receptora sprzężony z białkiem G (GPCR – G protein-coupled receptor).

Naukowcy zaczęli więc poszukiwania endogennej substancji, która byłaby naturalnym ligandem dla tego receptora, wykorzystując tzw. strategię receptora sierociego (ang. „orphan receptor strategy”). Polega ona na zaprojektowaniu linii komórkowej mającej na swojej powierzchni znany receptor i poszukiwaniu substancji, które się z nim łączą, mierząc aktywację drugiego przekaźnika. W momencie aktywacji receptora przez jakąś substancję dochodzi do wzrostu poziomu drugiego przekaźnika, a w konsekwencji, tak jak to mam miejsce w przypadku stymulacji przez grelinę wydzielania GH, wzrostu poziomu wewnątrzkomórkowego wapnia. W następnym etapie przeprowadza się próbę wyodrębnienia substancji, która przyłączyła się do receptora. W ten sposób rozpoczęto badania nad substancjami, które mogłyby aktywować receptor GHS-R, mając nadzieję na opracowanie nowej metody leczenia niedoboru hormonu wzrostu. Jak to zwykle bywa, za nim udało się odkryć grelinę zidentyfikowano szereg innych, nowych substancji – między innymi takich jak nocyceptyna [12], oreksyna [13], peptyd uwalniający prolaktynę [14], apelina [15], neuropeptyd B [16]. W przypadku greliny sytuacja była o tyle lepsza, że znano już sztucznie zsyntezowane substancje, które aktywowały GHS-R takie jak: GHRP-6 czy hexarelina, które mogły posłużyć jako kontrola aktywacji receptora. Wiele grup naukowców próbowało wyizolować tego typu ligand z ekstraktów z mózgu, przysadki i podwzgórza, znanych wówczas miejsc ekspresji GHS-R [17,18]. W 1999 roku Kojima i wsp. wyizolowali taką substancję z ekstraktu z żołądka i nazwali ją greliną. Nazwa pochodzi od słowa „ghre” pochodzącego z proto-indo-europejskiego języka oznaczającego „grow” – wzrost [19]. Prawie równocześnie inna grupa naukowców zidentyfikowała u myszy białko o tej samej sekwencji aminokwasów co grelina, której nadali nazwę „motilin related peptide” [20]. Różnica w czasie publikacji Kojimy i wsp. oraz Tomasetto i wsp. wynosiła ok. 6 miesięcy, ale Kojima zgłosił sekwencję greliny do EMBL Nucleotide Sequence Database jeden dzień wcześniej niż zrobił to Tomasetto. Co ciekawe oboje nie byli świadomi, że sekwencja ta była zgłoszona przez firmę Zymogenetic do urzędu patentowego w Stanach Zjednoczonych już w 1997 roku pod nazwą „homolog motyliny” [21]. Można więc powiedzieć, że grelina została niezależnie odkryta trzykrotnie. Tomasetto oraz firma Zymogenetic zidentyfikowała sekwencję aminokwasową greliny bazując na sekwencji nukleotydowej, dlatego też Kojima i wsp. uważa się za prawdziwych odkrywców tej substancji.

STRUKTURA GRELINY

Grelina jest 28-aminokwasowym peptydem, który jest pierwszym zidentyfikowanym naturalnym hormonem, w którym grupa hydroksylowa trzeciej seryny jest acylowana kwasem n-oktanowym. Jest to kluczowy element biologicznej aktywności greliny umożliwiający między innymi przejście przez barierę krew-mózg oraz aktywację receptora GHS-R (Rysunek 2) [22, 23].



Rysunek 2. Struktura 28-aminokwasowej ludzkiej greliny. W pozycji 3 występuje oktaacetylowana seryna.

Grelinę zidentyfikowano u wielu gatunków ryb, płazów i ssaków. Podobieństwo w składzie aminokwasowym jest bardzo duże, szczególnie jeżeli chodzi o pierwsze 10 aminokwasów końca NH_2 greliny. Świadczy to o tym, że właśnie ten fragment cząsteczki jest kluczowy dla biologicznej funkcji greliny. Dla przykładu grelina ludzka i szczurza różnią się tylko dwoma aminokwasami (Tabela 1).

Tabela 1. Sekwencja aminokwasowa greliny wśród różnych gatunków ssaków. Dla porównania przedstawiono również sekwencję aminokwasową ludzkiej greliny [22].

Ssaki:	1	10	20	28																									
Człowiek	G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	R	V	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R	
Małpa	G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	R	A	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R	
Rezus																													
Mysz	G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	K	A	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R	
Myszokoczek mongolski	G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	K	T	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R	
Szczur	G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	K	A	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R	
Pies	G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	K	L	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R	
Świnia	G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	K	V	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	A	A	K	L	K	P	R	
Owca	G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	K	L	Q	-	R	K	E	P	K	K	P	S	G	R	L	K	P	R	
Wół	G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	K	L	Q	-	R	K	E	A	K	K	P	S	G	R	L	K	P	R	

W czasie oczyszczania greliny z żołądka szczurów Kojima i wsp. zidentyfikowali również inne formy greliny, różniące się przyłączoną cząsteczką w pozycji 3, gdzie występuje seryna: niezacylowaną formę, acylowaną kwasem oktanowym (C8:0), kwasem dekanowym (C10:0), kwasem dekanowym z jednym podwójnym wiązaniem (C10:1) oraz formę będącą wynikiem alternatywnej formy składania genu greliny (ang. splicing) – grelina des-Gln¹⁴, która jest homologiczna do greliny ale nie posiada glutaminy w pozycji 14. Wszystkie te peptydy mają długość 27-28 aminokwasów i wywodzą się z tego samo genu. Odmienność tych form jest spowodowana różną drogą potranslacyjnej obróbki [24].

U ludzi główną, aktywną formą jest 28-aminokwasowa grelina, której grupa hydroksylowa seryny w pozycji trzeciej jest estryfikowana kwasem oktanowym. Stanowi ona ok. 3-20% całkowitego stężenia greliny w surowicy krwi [25]. Acylotransferaza, odpowiedzialna za ww. estryfikację, nie została dotychczas zidentyfikowana [26].

Badania z analogami greliny zawierającymi różne grupy alifatyczne i aromatyczne w łańcuchu bocznym trzeciej reszty aminokwasowej oraz krótkołańcuchowymi peptydami otrzymanymi z greliny, wykazały, że obecność dużej hydrofobowej grupy w łańcuchu bocznym trzeciej reszty aminokwasowej jest kluczowa dla maksymalnej aktywności agonistycznej [26]. Typ kwasu tłuszczowego również nie ma większego znaczenia dla biologicznej aktywności greliny. Wykazano w badaniach, że 4-aminokwasowa pochodna greliny: Gly-Ser-Ser(n-oktanowy)-Phe-NH₂ aktywuje receptor grelinowy w tym samym stopniu co 28-aminokwasowa grelina. Dalsze skrócenie cząsteczki do 3 aminokwasów powodowało jednak utratę tej funkcji [27,28,29].

Interesujący jest fakt, że prepromotylin, która jest również produkowana przez komórki enteroendokryjne żołądka, jest prawie identyczna z ludzką preprogreliną (różnią się resztą aminokwasową seryny w pozycji 26). Natomiast motylina i grelina wykazują homologię strukturalną jedynie w 36% [30].

Z kolei des-acylowana forma greliny, która dotychczas była uważana za pozbawioną aktywności biologicznej, występuje zarówno w żołądku jak i we krwi w znacznie wyższych stężeniach niż jej biologicznie aktywna forma. Krąży ona w surowicy krwi jako wolny peptyd podczas gdy forma acylowana związana jest z dużymi molekułami (miedzy innymi apolipoproteiną A1) [31]. Badanie dowiodły, że niezestryfikowana grelina może jednak odgrywać rolę w stymulacji proliferacji komórek raka prostaty *in vitro*, adipogenezie, w układzie sercowo-naczyniowym działając rozszerzająco na naczynia krwionośne oraz może hamować apoptozę kardiomiocytów. Prawdopodobnie działania te są mediowane przez dotychczas niezidentyfikowany receptor GHS-R [32,33, 34].

Pytanie, które nadal pozostaje bez odpowiedzi to, czy des-acylowana forma greliny jest pierwotną formą greliny czy może produktem desacylacji.

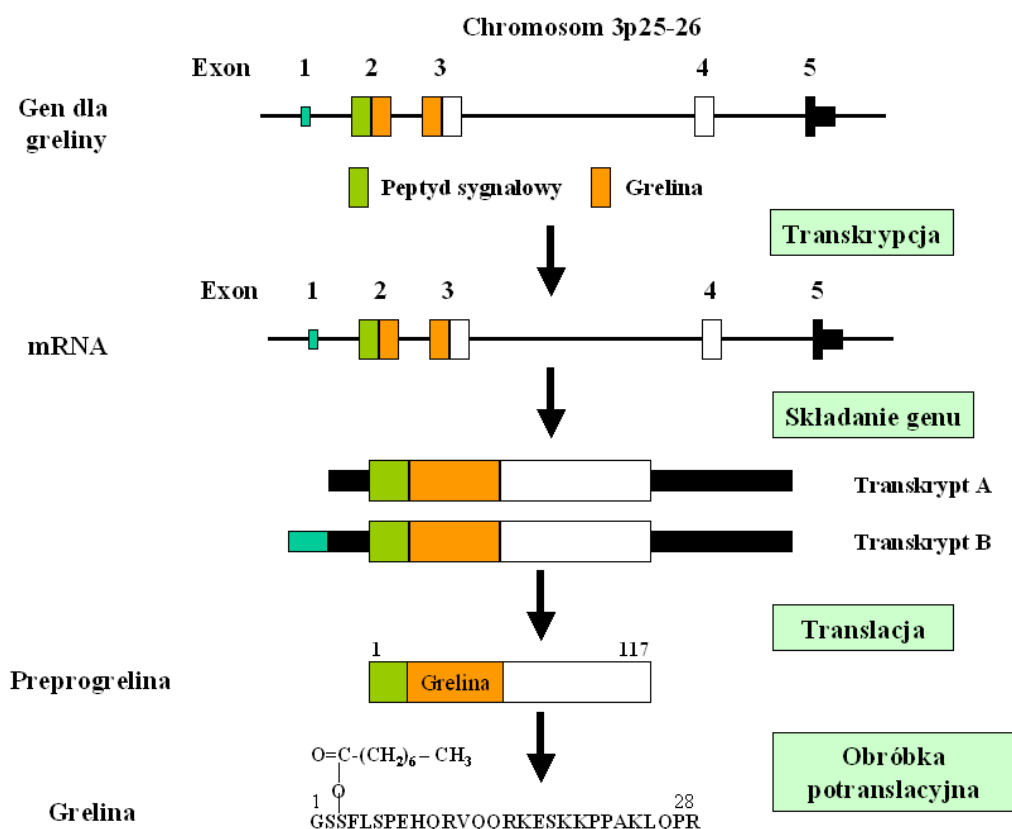
Tabela 2. Zestawienie dotychczas opublikowanych badań dotyczących aktywności biologicznej desacylowanej greliny [35].

	Zwierzęta		Ludzie	
	in vitro	in vivo	in vitro	in vivo
Wpływ na wydzielanie insuliny / metabolizm glukozy	X	-	-	X
Wpływ na adipogenezę / różnicowanie adipocytów	X	-	-	-
Protekcyjne działanie na niedokrwienne uszkodzenie kardiomiocytów	X	-	-	-
Wpływ na zdolność kurczliwą mięśnia sercowego	X	-	-	-
Wpływ na apoptozę / różnicowanie komórek	X	-	X	-

POWSTAWANIE GRELINY

Gen greliny zlokalizowany jest na chromosomie 3p25-26. Natomiast gen dla jej receptora na chromosomie 3 w pozycji q26-27 [36].

Gen ludzkiej greliny składa się z 5 eksonów. Pierwszy z nich zawiera jedynie 20 par zasad, które kodują nie podlegający translacji odcinek. Gen ten posiada dwa miejsca starterowe transkrypcji co powoduje, że możliwe jest powstanie dwóch rodzajów transkryptów mRNA (transkrypt A oraz transkrypt B). 28-aminokwasowa grelina jest kodowane przez ekson 1 i 2 (Rysunek 3) [38, 37].



Rysunek 3. Schemat przedstawiający powstawanie aktywnej formy greliny [22].

Skład aminokwasowy preprogreliny jest bardzo podobny u wielu gatunków ssaków. 28-aminokwasowa grelina poprzedzona jest peptydem sygnałowym, a miejsce odcięcia występuje w tym samym miejscu u wszystkich gatunków ssaków [38].

Kojima i wsp. wykazali w badaniach przeprowadzonych na myszach, że typ spożywanego kwasu tłuszczowego ma bezpośredni wpływ na typ grupy acylowej przyłączanej do greliny w czasie obróbki potranslacyjnej. I tak na przykład spożycie średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych lub średniołańcuchowych trójglicerydów powoduje wzrost stężenia acylowanej greliny przy braku wpływu na całkowite stężenie greliny w surowicy krwi [22].

Interesujący jest fakt, że aktywator ekspresji genu greliny w różnych komórkach został zidentyfikowany w różnych miejscach genu. Może to sugerować zależną od typu komórki aktywację ekspresji tego genu [38, 39].

MIEJSCA PRODUKCJI GRELINY

1. Przewód pokarmowy

U wszystkich kręgowców grelina produkowana jest głównie w żołądku przez komórki X/A błony śluzowej żołądka (około 20% populacji komórek endokrynych żołądka), stanowiąc główne źródło endogennej greliny [40]. Występują one we wszystkich regionach żołądka, jednak największa ich gęstość obserwowana jest w dnie żołądka [41,42,43,44,45]. Komórki te mogą zostać wybarwione wykorzystując przeciwciała przeciwko końcowi NH-2 acylowanej formy greliny [31]. Liczba tych komórek wzrasta wraz z wiekiem [46].

Komórki produkujące grelinę można podzielić na komórki otwarte oraz komórki zamknięte, w zależności od posiadania przez nie kontaktu z światłem gruczołów. W żołądku mamy do czynienia z typem zamkniętym. Są one zlokalizowane w pobliżu blaszki właściwej błony śluzowej gdzie znajdują się naczynia kapilarne, nie komunikując się z światłem gruczołów właściwych żołądka.

Ilość komórek wydzielających grelinę typu otwartego rośnie stopniowo w kierunku od żołądka do dystalnego odcinka przewodu pokarmowego [31,41,47].

2. Mózg

Badania immunohistochemiczne doprowadziły do zlokalizowania neuronów zawierających grelinę: w podwzgórzu w neuronach sąsiadujących z trzecią komorą pomiędzy jądrem grzbietowym, brzuszynym, przykomorowym oraz łukowatym. Komórki te wysyłają włókna nerwowe do neuronów wydzielających neuropeptyd Y (NPY) oraz agouti-related protein (AgRP) stymulując wydzielanie tych białek. Lokalizacja ta przemawia za udziałem greliny w regulacji przyjmowania pokarmów. Z kolei grelina wydzielana przez komórki przysadki może stymulować wydzielanie GH w sposób auto- lub parakryny [19,48]

Badania kolejnych lat przyniosą z pewnością dowody produkcji greliny również przez inne komórki centralnego systemu nerwowego. Świadczy o tym fakt, że grelina może uczestniczyć w regulacji procesów związanych ze snem, pamięcią oraz emocjami.

3. Trzustka

Ostatnie badania doprowadziły również do odkrycia nowego rodzaju komórek wysp trzustkowych – tzw. ϵ -komórek, posiadających unikalną ultrastrukturę, zupełnie odmienną od pozostałych komórek wyspowych i produkujących grelinę.

W trzustce ilość komórek produkujących grelinę zmienia się znacząco po porodzie. W życiu płodowym ok. 10% komórek endokrynych trzustki produkuje grelinę. Po porodzie liczba tych komórek znacznie spada – ekspresja mRNA dla greliny oraz koncentracja greliny w trzustkach płodowych jest ok. 7 razy większa w porównaniu do płodowych komórek żołądka [46]. Interesującym odkryciem jest białko Nkx2.2, które jest kluczowym elementem różnicowania się trzustkowych komórek alfa i beta. Brak tego białka u myszy powoduje, że zamiast ww. komórek endokrynych wysp trzustkowych powstają komórki produkujące grelinę [49]. Ponadto, na podstawie wstępnych badań sugeruje się parakryny wpływ greliny na wydzielanie insuliny u dorosłych ludzi [50, 51, 52,53, 54].

3. Układ sercowo-naczyniowy

O działaniu greliny w obrębie układu sercowo-naczyniowego świadczyć może fakt, że mRNA greliny oraz receptor GHS-R zaobserwowano zarówno w komórkach mięśnia serowego jak i naczyń krwionośnych. Dotychczasowe badania pozwalają sądzić, że grelina oddziałuje na komórki układu sercowo-naczyniowego najprawdopodobniej po przez nieodkryty dotąd receptor grelinowy.

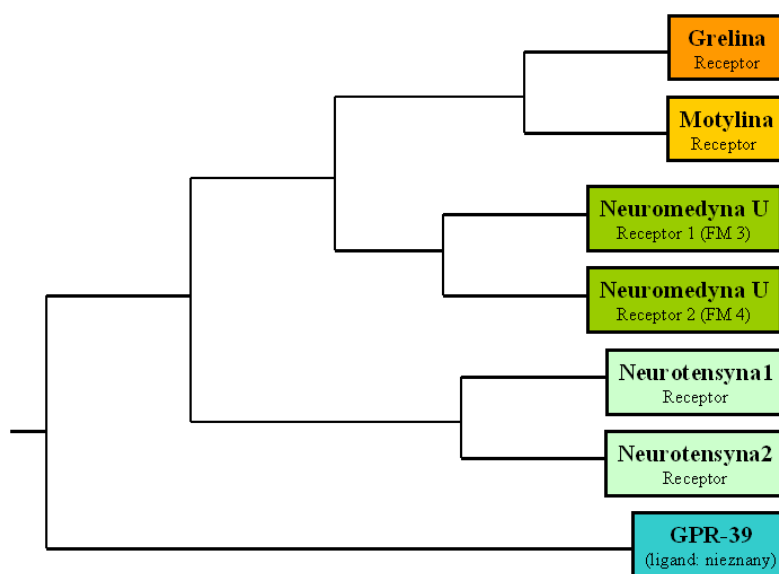
4. Inne tkanki

Komórki nerek, a szczególnie kłębuszków również produkują grelinę. Stężenie greliny znamienne korelowało ze stężeniem kreatyniny w surowicy krwi i było o około 2,8-razy większe w końcowym stadium niewydolności nerek w porównaniu do zdrowej grupy kontrolnej. Może to wskazywać, że nerki są istotnym elementem usuwania i/lub degradacji greliny [55]. Komórki produkujące grelinę zidentyfikowano również w cytotrofoblastie w pierwszym trymestrze ciąży. W kolejnych dwóch trymestrach komórki te były niewykrywalne. Zidentyfikowano także inne komórki produkujące grelinę – między innymi komórki Leydiga i Sertoliego w jądrach [56,57].

Najprawdopodobniej dalsze badania przyniosą nowe doniesienia o kolejnych komórkach posiadających możliwość produkowania greliny.

RECEPTOR GRELINOWY

Grelina działa poprzez receptor GHS-R (growth hormone secretagogue receptor), który wchodzi w skład dużej rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G (G protein-coupled receptor – GPCR). Pod względem składu aminokwasowego GHS-R jest w 52% identyczny z receptorem dla motyliny oraz w 34,9% z receptorem dla neurotensyny (Rysunek 4) [58,59,60].



Rysunek 4. Rodzina receptorów związanych z białkiem G (GPCR) [19]

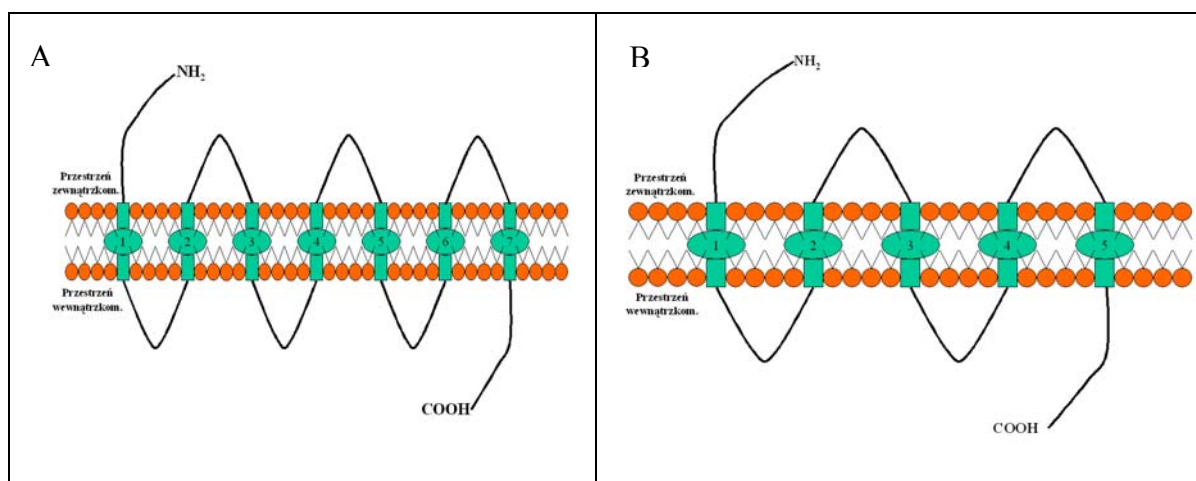
W tym miejscu warto zaznaczyć, że motylina może w bardzo niewielkim stopniu aktywować receptor grelinowy. Natomiast dotychczas nie zaobserwowano aby grelina mogła aktywować receptor motylinowy [60].

Ludzki GHS-R 1a wykazuje odpowiednio 96% i 93% zgodności z receptorem GHS-R 1a szczura i świni. Prawdopodobnie receptor ten istnieje już od czasów prekambryjskich. Świadczy o tym fakt, że sekwencja aminokwasów tego receptora zidentyfikowana u ryb z gatunku teleostan, jest bardzo zbliżona do sekwencji receptora ludzkiego. Obserwacje te, mogą świadczyć o znacznej konserwatywności GHS-R 1a oraz jego kluczowym znaczeniu dla funkcjonowania organizmu [11].

Występuje on w dwóch podtypach: typ 1a (366 aminokwasów, masa cząsteczkowa 41 kDa i posiada 7 przezłonowych domen) oraz 1b (289 aminokwasów, posiadający jedynie 5

domen). Receptor 1b powstaje przez zmianę ramki odczytu co powoduje pojawienie się kodonu „stop”. Dotychczas uważano, że jedynie receptor typu 1a wykazuje aktywność biologiczną. Coraz więcej doniesień przemawia jednak za tym, że również receptor typu 1b ma swoją funkcję biologiczną (Rysunek 5) [11].

Gen kodujący receptor grelinowy składa się z dwóch eksonów. Pierwszy koduje pięć pierwszych domen (TM1-5), drugi dwie kolejne domeny (TM6-7). Natomiast receptor 1b jest produktem tylko pierwszego eksonu. Region promotorowy genu dla GHS-R nie zawiera typowych sekwencji aminokwasowych takich jak TATA, CAAT, GC ale posiada wiele miejsc przyłączeniowych dla czynników transkrypcyjnych oraz hormonów – np. estrogenów [61].



Rysunek 5. A) Receptor GHSR-1a, B) Receptor GHSR-1b

Jest wysoce prawdopodobne, że istnieją inne, dotychczas niepoznane typy tego receptora. Zhang i wsp. badając wiązanie znakowanej izotopem greliny do linii komórek tkanki tłuszczowej 3T3-L1 nie potrafili zidentyfikować typu receptora do którego wiązała się grelina. To samo zaobserwowała inna grupa badaczy odnośnie kardiomiocytów H9c2 [62].

Przyłączenie greliny oraz GHS do receptora GHS-R 1a aktywuje szlak fosfolipazy C, prowadząc do zwiększenia ilości inozytolo-1,4,5-fosforanu oraz diacyloglicerolu z następnym uwolnieniem jonów Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych [63]. Aktywacja GHS-R prowadzi również do zahamowania kanałów K^+ , co pozwala na napływ jonów Ca^{2+} przez bramkowane potencjałem kanały typu L (ale nie typu T). Syntetyczne GHS, grelina oraz des-Gln14-grelina łączą się z wysokim powinowactwem do receptora GHS-R 1a. Ich zdolność do wypierania MK-0677 oraz $[^{125}I][Tyr^4]$ greliny z połączeń z błonami przysadki dobrze koreluje ze stężeniami koniecznymi do stymulacji uwalniania GH [38].

Ciekawą obserwacją jest możliwość przyłączania się adenozyiny do receptora GHS-R1a in vitro. Nie wywołuje to żadnej aktywności biologicznej - np. stymulacji wydzielania GH. Przyłącza się ona jednak do innego miejsca receptora niż GHS. Nowsze doniesienia opisują, że GHS-R może być również miejscem wiązania innych endogennych cząsteczek takich jak kortystatyna czy substancja P. Odkrycia te przemawiają za hipotezą, że naturalne ligandy inne niż grelina czy adenozyina mogą modulować aktywność GHS-R [64, 65].

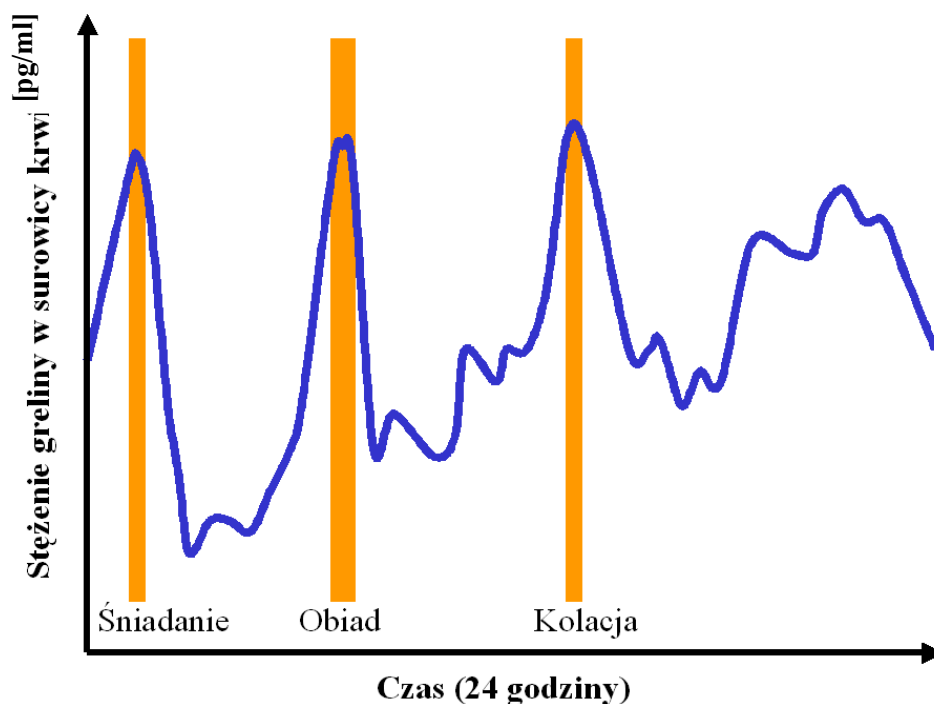
Obecność receptorów GHS-R zidentyfikowano obecnie w wielu narządach: przysadce, podwzgórzu, innych regionach mózgu odpowiadających za nastrój, pamięć i uczenie się, nadnerczach, jajnikach, jądrach, naczyniach krwionośnych, sercu, płucach, wątrobie, trzustce, mięśniach szkieletowych, nerkach, tarczycy, tkance tłuszczowej, jelicie, węzłach chłonnych, komórkach układu immunologicznego, skórze oraz włóknach nerwowych - m. in. jest produkowany w neuronach nerwu błędnego, a następnie za pomocą transportu aksonalnego jest transportowany na powierzchnię zakończeń nerwowych [17,66,67,68].

Receptor GHS-R wykazuje stałą aktywność bez obecności agonisty wynoszącą ok. 50% aktywności wykazywanej w obecności stymulatora receptora [69]. Pantel i wsp. w swoich badaniach dowodzą, że stała aktywność receptora grelinowego jest kluczowa w uzyskaniu odpowiedniego wzrostu u ludzi oraz może uczestniczyć w rozwoju otyłości. Autorzy badając receptor GHS-R u ludzi z niskim wzrostem oraz otyłych stwierdzili jego mutację punktową: Ala240Glu. Co ciekawe mutacja ta nie miała wpływu na powinowactwo greliny do receptora i jego funkcjonowanie pod wpływem agonisty. Zaburzała jednak wewnętrzną aktywność receptora. W tych samych badaniach stwierdzono, że wewnętrzna aktywność receptora jest proporcjonalna do stopnia ekspresji receptora GHSR [70].

REGULACJA WYDZIELANIA

Podobnie jak w przypadku innych hormonów, poziom greliny w surowicy krwi jest wypadkową różnych procesów zachodzących w organizmie. Ich wzajemna zależność jest nadal przedmiotem intensywnych badań. Niektóre z nich wymieniono poniżej:

- 1) Regulacja transkrypcji oraz translacji genu greliny
- 2) Poziom aktywności enzymatycznej dotychczas niezidentyfikowanej acylotransferazy, odpowiedzialnej za potranslacyjną estryfikację cząsteczki greliny
- 3) Tempo sekrecji aktywnej cząsteczki greliny
- 4) Domniemane, enzymatyczne procesy deaktywacji krążącej greliny
- 5) Możliwy wpływ białek wiążących grelinę na aktywność hormonalną
- 6) Różna „dostępność” tkanki docelowej (transport przez barierę krew – mózg)
- 7) Usuwanie lub rozkład greliny przez nerki lub wątrobę
- 8) Stężenie krążących dodatkowych endogennych ligandów oraz innych mogących reagować krzyżowo hormonów
- 9) Ilość receptorów w tkance docelowej
- 10) Jej wrażliwość/odpowiedź na wewnątrzkomórkowe mechanizmy sygnalizacyjne.

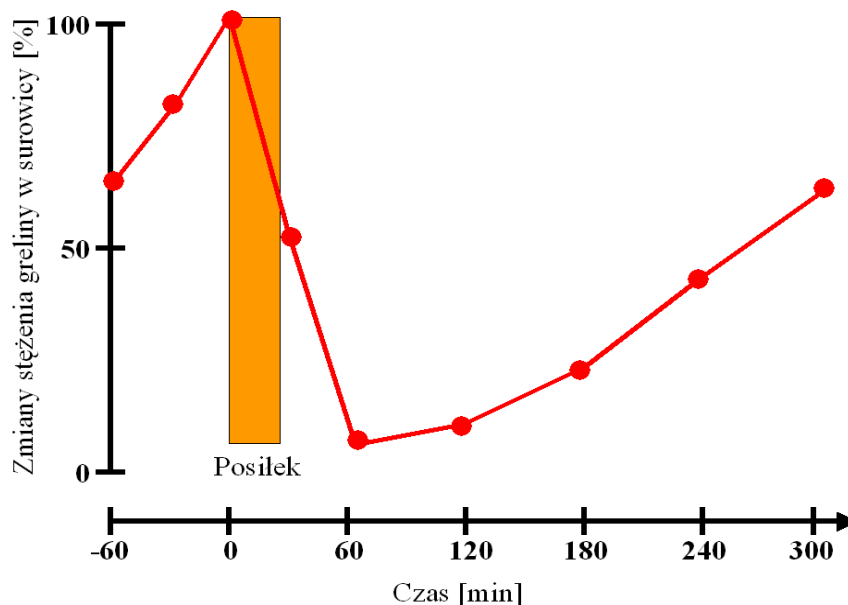


Rysunek 6. Zmiany stężenia greliny w surowicy krwi w ciągu dnia [na podstawie: Cummings i wsp. Diabetes 2001; 50: 1714].

Obecnie nie jest do końca jasne w jaki sposób czynniki te regulują poziom greliny w surowicy krwi. U zwierząt grelina wydzielana jest w sposób pulsacyjny, zależny od czasu przyjęcia posiłku i niezależny od poziomu GH [71]. Z kolei u ludzi poziom greliny zmienia się w ciągu dnia, wzrastając przed posiłkiem i zmniejszając się po jego zakończeniu [72]. Poza zmianami związanymi z przyjęciem posiłku poziom greliny wzrasta również w czasie snu (Rysunek 6 i 7). W grupie otyłych ludzi oraz pozbawionych snu nie obserwuje się tego wzrostu [73, 74].

Ostatnie badania przeprowadzone przez Drazen i wsp. dowodzą że wzrost poziomu greliny poprzedzający posiłek nie jest wyłącznie kwestią braku substratów energetycznych, ale również pewnym nawykiem ściśle korelującym z czasem oraz dostępnością pokarmu. Do sprawdzenia tej teorii wykorzystano szczury przyzwyczajone do przyjmowania pokarmu o stałych porach. Mimo braku pokarmu statystycznie znamieny wzrost poziomu greliny zaczynał się około 2 godziny przed planowanym czasem posiłku, z szczytem poprzedzającym go o ok. 30-60 minut. W mechanizmie przedposiłkowego wzrostu stężenia greliny może uczestniczyć nerw błędny ponieważ wagotomia powoduje zarówno u zwierząt jak i ludzi zahamowanie przedposiłkowego wzrostu stężenia greliny [75].

Wielkość poposiłkowego spadku poziomu greliny jest proporcjonalna do ilości kalorii spożytych w czasie posiłku oraz rodzaju spożytego pokarmu. I tak największy spadek obserwuje się po spożyciu glukozy, następnie białek, a najmniejszy spadek występuje po spożyciu tłuszczu [76, 77]. Zależność poziomu greliny od ilości spożytych tłuszczu była różna w różnych badaniach. Tentolouris i wsp. nie obserwowali spadku aktywnej formy greliny po wysoko tłuszczowym posiłku u zdrowych ludzi z prawidłową masą ciała [78]. Podczas gdy w innych badaniach obserwowano spadek stężenia całkowitej greliny zarówno po nasyconych oraz nienasyconych kwasach tłuszczowych. Natomiast aktywna forma greliny pozostawała nie zmieniona po posiłku składającym się z nienasyconych kwasów tłuszczowych [79, 80,81]. W innym badaniu obserwowano szybszy spadek aktywnej formy greliny po standaryzowanym posiłku w porównaniu do spadku poziomu całkowitej greliny [82].



Rysunek 7. Zmiany stężenia greliny w surowicy krwi w zależności od posiłku [22].

Mechanizm tego spadku nie jest obecnie jasny. Rozciąganie żołądka za pomocą wody nie powoduje zmian w poziomie greliny w surowicy krwi, co świadczy, że mechaniczne rozciąganie żołądka nie wpływa na poziom greliny [22]. Kontakt żołądka z pokarmem również wydaje się nie być konieczny, ponieważ spadek poziomu greliny można uzyskać zarówno po przez doustne jak i dożylnie podanie glukozy. Potwierdzeniem tej obserwacji jest również eksperyment przeprowadzony przez Williamsa i wsp., którzy podawali glukozę doustnie uniemożliwiając opróżnianie żołądka u szczurów za pomocą nadmuchiwanego rękawa umiejscowionego wokół odźwiernika. Obserwowano wówczas brak poposiłkowego spadku poziomu greliny [83]. Ta sama grupa badaczy wykazała również, że podanie pokarmu tylko do dwunastnicy lub tylko do jelita cienkiego szczurów powoduje podobny poposiłkowy spadek stężenia greliny we krwi. Wynika z tego, że obecność pokarmu w dwunastnicy nie jest również warunkiem koniecznym do tego spadku [84,85]. Brak jest obecnie w literaturze badań opisujących jak wygląda tego typu regulacja u ludzi.

Udział innych hormonów w regulacji poziomu greliny jest nadal przedmiotem intensywnych badań. Egzogenne podanie insuliny powoduje co prawda spadek poziomu greliny, to jednak jej wzrost związany z posiłkiem nie jest konieczny do uzyskania poposiłkowego spadku poziomu greliny. Schaller i wsp. przeprowadzili badania z podwójną ślepą próbą dowodząc, że poposiłkowy spadek poziomu greliny jest niezależny od glukozy oraz insuliny [86]. Z kolei podając doustnie tłuszcze nie obserwuje się wzrostu stężenia insuliny, natomiast dochodzi do spadku poziomu greliny w surowicy krwi [87].

Prawdopodobnie do spadku poziomu greliny wystarczający jest podstawowy poziom insuliny w surowicy krwi. Świadczyć o tym może przykład pacjentów z cukrzycą typu 1. Przy braku suplementacji insuliny nie dochodziło do poposiłkowego spadku poziomu greliny. Natomiast podanie wymaganej dawki insuliny powodowało, obserwowany w zdrowej grupie kontrolnej, spadek jej poziomu [88].

Poziom greliny koreluje również odwrotnie proporcjonalnie do BMI (body mass index). Jedynym odstępstwem od tej zależności jest zespół Prader-Willi, gdzie otyłości towarzyszy wysokie stężenie greliny [89]. U osób otyłych stężenie greliny na czczo w surowicy krwi jest znacznie niższe niż u ludzi z prawidłową wagą oraz nie obserwuje się zmian dobowego rytmu wydzielania greliny. Niski poziom tego hormonu obserwowany u otyłych ludzi jest raczej związany z opornością na insulinę niż z indeksem masy ciała. Potwierdziły to badania McLaughlin i wsp., którzy zaobserwowali wyższy poziom greliny w surowicy krwi u otyłych ludzi bez insulinooporności w porównaniu z otyłą grupą ludzi o tej samej wadze, ale z obecną insulinoopornością [90].

Z kolei poziom greliny rośnie u osób u których dochodzi do spadku masy ciała. Można to tłumaczyć brakiem dostarczania pokarmu do przewodu pokarmowego, ale okazuje się że u osób przyjmujących posiłki ale chudnących poziom podstawowy greliny podnosi się w porównaniu do grupy ludzi przyjmujących ten sam posiłek ale u których nie obserwuje się spadku masy ciała. Może to świadczyć o tym, że podstawowy poziom greliny odzwierciedla masę ciała, niezależnie od typu spożywanego posiłku [91].

Kompozycja diety ma również wpływ na poziom greliny. W przeprowadzonych przez Robertsona i wsp. badaniach w grupie mężczyzn, którzy przez 3 tygodnie spożywali wysoko tłuszczową dietę, a ich waga nie zmieniła się w sposób statystycznie znamieny, doszło do redukcji stężenia greliny w surowicy krwi [92,93].

Z kolei podanie GH zmniejsza ekspresję mRNA dla greliny w komórkach żołądka, ale nie zmniejsza ilości zmagazynowanej greliny w tych komórkach [94]. Usunięcie żołądka u szczurów i ludzi zmniejsza stężenie greliny w surowicy krwi o około 80%. Wraz z czasem, kompensacyjna produkcja greliny w innych miejscach organizmu może spowodować, że stężenie greliny osiągnie poziom występujący przed operacją [95]. Odmienne wyniki otrzymali z kolei Ariyasu i wsp., którzy obserwowali u pacjentów po całkowitym wycięciu żołądka w długoterminowym aspekcie (1-8 lat po operacji) poziom greliny rzędu ok. 35% poziomu przedoperacyjnego. Z kolei w grupie osób otyłych poddanych operacji omijającej żołądek poziom greliny zmniejszył się o 77% w porównaniu do grupy z prawidłową wagą oraz o 72% w porównaniu z grupą ludzi otyłych. Poposiłkowy poziom insuliny oraz zmiany

poziomu leptyny były w tej grupie pacjentów prawidłowe. Jest to o tyle interesujące, że w tej grupie pacjentów należałoby się spodziewać wzrostu poziomu greliny związanego z dużym spadkiem masy ciała [96]. Chociaż inne badania nie potwierdziły tych obserwacji [97,98].

Obecnie brak jest danych w literaturze odnośnie czasu połowicznego rozkładu. Musi on być jednak bardzo krótki ponieważ w godzinę po całkowitym usunięciu żołądka u pacjentów dochodzi do znacznego spadku poziomu greliny w surowicy krwi [99].



Rysunek 8. Stany kliniczne związane ze zmianami poziomu greliny u ludzi [35].

FIZJOLOGICZNE FUNKCJE GRELINY

DZIAŁANIE OŚRODKOWE

1. Stymulacja wydzielania hormonu wzrostu

Wydzielanie hormonu wzrostu (GH – growth hormone) regulowane jest przez dwie substancje: GHRH (stymuluje wydzielanie) oraz somatostatynę (hamuje wydzielanie), które wpływają na pulsacyjne (10-20 pulsów/24h) wydzielanie GH w ciągu doby. Czas pulsów jest kontrolowany przez okresowe wydzielanie somatostatyny, natomiast amplituda pulsu przez GHRH [100]. Trzecim, niedawno odkrytym, czynnikiem regulującym wydzielanie GH jest właśnie grelina [19,101,102].

Grelina jest uważana za najsilniejszy z dotychczas poznanych stymulatorów wydzielania hormonu wzrostu – podanie dożylnie u szczurów wywoływało 3-krotnie większy wzrost wydzielania hormonu wzrostu w porównaniu do GHRH. Podobną sytuację zaobserwowano u ludzi. Grelina stymuluje wydzielanie GH w sposób zależny od dawki z punktem max. po ok. 5-15 minutach i powrotem do stężenia wyjściowego w ciągu ok. 1 godziny od podania. Podobne, ale znacznie silniejsze działanie w porównaniu do podania obwodowego obserwowano po dokomorowym podaniu greliny [101,103].

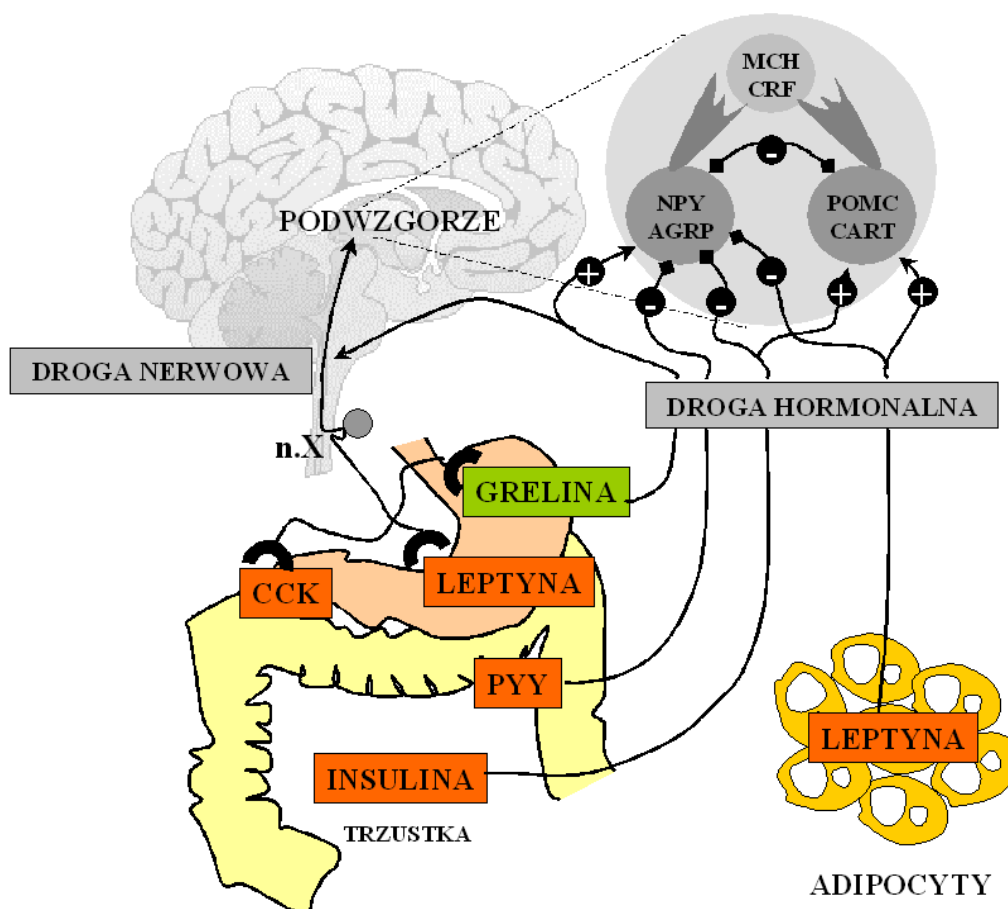
Wydzielanie hormonu wzrostu spowodowane jest zarówno bezpośrednią stymulacją przysadki [19], jak i działaniem greliny na podwzgórze - ludzie z organicznymi uszkodzeniami podwzgórza mieli obniżone stężenie hormonu wzrostu, nawet po stymulacji greliną [104]. Z kolei wyizolowane komórki przysadki i stymulowane greliną nie wydzielają takiej ilości GH aby zapewnić stężenie porównywalne z stężeniem w surowicy krwi. Wynika z tego, że również inne czynniki mają wpływ na maksymalne wydzielanie hormonu wzrostu po stymulacji greliną. Jednym z nich może być, zaproponowany przez autorów badania, nerw błędny. U pacjentów po wagotomii zmniejsza się znacznie wydzielanie GH w odpowiedzi na obwodowe podanie greliny [105,106].

Z kolei podanie równoczesne GHRH i greliny wzajemnie wzmacniało swoje działanie. Nie mniej jednak GHS potrzebują GHRH aby w pełni ujawnić swoje działanie uwalniające GH. Dowodem tego jest fakt, że odpowiedź GH na GHS jest znacznie osłabiona u ludzi, którym podano antagonistów GHRH lub w przypadku braku połączenia między podwzgórzem a przysadką. Ponadto, pacjenci z deficytem receptora dla GHRH nie wykazują wzrostu stężenia GH po stymulacji GHS, przy zachowanym wzroście PRL, ACTH oraz kortyzolu [7,8,107].

2. REGULACJA APETYTU

Odżywianie jest podstawową funkcją organizmów żywych i jest niezbędne do życia. Jest powszechnie uznane, że to centralny system nerwowy kontroluje procesy odżywiania, a szczególnie jego część zwana podwzgórzem. Usunięcie bocznej części podwzgórza u zwierząt powoduje brak apetytu i prowadzi do drastycznego spadku masy ciała. Z kolei usunięcie regionu przysrodkowego podwzgórza powoduje nadmierne uczucie głodu co powoduje wzrost masy ciała.

Chociaż grelina została odkryta jako endogenny ligand dla receptora hormonu wzrostu bardzo szybko okazało się, że ma ogromne znaczenie w regulacji apetytu oraz masy ciała zarówno w aspekcie krótko- jak i długoterminowym. Działa zarówno centralnie jak i obwodowo, co czyni ją jedynym obwodowym czynnikiem o charakterze oreksygenicznym. Większość peptydów podwzgórzowych takich jak NPY, AgRP, oreksygenina i galanina stymulują apetyt podane centralnie, ale w przeciwieństwie do greliny nie działają obwodowo. Stałe podawanie greliny u ludzi prowadzi do wzrostu masy ciała oddziałując na różnych poziomach homeostazy energetycznej [108].



Rysunek 9. Schemat ideowy podwójnej drogi działania greliny na podwzgórze - na podstawie pracy [109].

To stymulujące apetyt działanie greliny może zostać zablokowane za pomocą antagonisty receptora NPY. Podobne działanie ma również dokomorowe podanie inhibitorów AgRP. Grelina jest w tym rejonie również naturalnym antagonistą leptyny [111,112,113,114].

Jak już wcześniej wspomniano podanie obwodowe greliny stymuluje również neurony podwzgórza zwiększając uczucie apetytu [115,116,117,118]. Badania na zwierzętach wykazały, że grelina podana obwodowo przechodzi w niewielkich ilościach przez barierę krew-mózg, co sugeruje, że oddziaływanie na podwzgórze musi odbywać się również drogą pośrednią. Dalsze badania pozwoliły na zidentyfikowanie receptorów grelinowych na powierzchni neuronów nerwu błędnego. Uważa się, że właśnie tą drogą grelina z obwodu wpływa na neurony podwzgórza [105,119,120,121]. Z kolei wykazano, że wagotomia nie ma wpływu na podstawowy poziom greliny, ale całkowicie blokuje wzrost poziomu greliny wywołany brakiem pożywienia. Podobny efekt osiągnięto podając atropinę [105,106,122]. Wagotomia nie zaburza również działania greliny po podaniu centralnym, co mogłoby sugerować obecność dwóch, częściowo niezależnych, systemów wydzielania: centralnego i obwodowego [123].

Grelina reguluje apetyt zarówno w aspekcie krótkoterminowym jak i długoterminowym. O tym pierwszym świadczy wzrost stężenia greliny w surowicy krwi bezpośrednio przed posiłkiem oraz jej spadek do minimum w ciągu paru godziny po jedzeniu. Wskazuje to, że grelina jest czynnikiem inicjującym spożywanie pokarmu [124,125]. Przedposiłkowy wzrost poziomu greliny był jednak obserwowany tylko w przypadku nieprzymuszonej chęci przyjmowania pokarmu [126]. Badania wykazały wprost proporcjonalną zależność między głodem ocenianym w skali liczbowej, a poziomem greliny w surowicy krwi. Wielkość poposiłkowego spadku stężenia greliny jest z kolei proporcjonalna do ilości spożytych kalorii oraz składu posiłku [127]. W jaki sposób pokarm hamuje wydzielanie greliny nie jest do końca jasne. Przeprowadzone badania, wykorzystujące izokaloryczny posiłek, wykazały, że tłuszcze najmniej efektywnie hamują poposiłkowy spadek stężenia greliny w porównaniu do cukrów i białek. Ten relatywnie mały spadek może być jednym z mechanizmów powstawania otyłości w skutek spożywania wysokotłuszczowej diety. Ponadto stwierdzono, że poposiłkowy spadek stężenia greliny jest mniejszy u ludzi otyłych, co może przyczyniać się do dalszego utrzymania nadmiaru masy ciała [128]. W spadku stężenia greliny ma również udział nerw błędny. U osób u których poprzedzono właściwy posiłek pozorowanym posiłkiem (ang. sham feeding) był obserwowany większy i szybszy spadek greliny w porównaniu do grupy kontrolnej spożywającej jedynie posiłek

[129]. Ponadto wykazano, że grelina zwiększa apetyt zarówno u szczupłych jak i u otyłych ludzi. Wzrost apetytu jest jednak większy u ludzi otyłych [130].

Grelina podobnie jak leptyna oraz insulina spełnia wszystkie kryteria hormonu regulującego masę ciała w aspekcie długoterminowym. Podobnie jak wymienione hormony, jej stężenie we krwi odzwierciedla zasoby energetyczne ustroju. U ludzi otyłych obserwuje się zmniejszony poziom podstawowy greliny, a u ludzi niedożywionych, z kacheksją, z anoreksją/bulimią, przewlekłą niewydolnością krążenia i nerek znacznie podwyższony w porównaniu do grupy kontrolnej. Podobnie, ekspresja receptora dla greliny w podwzgórzcu zwiększa się znacznie w okresie przedłużającego się braku pożywienia [131].

Niższe stężenie greliny u ludzi otyłych może być spowodowane podwyższeniem poziomu insuliny. Jednak inne prace nie potwierdzają tej teorii. Natomiast zostało udowodnione, że insulina jest konieczna do poposiłkowego spadku poziomu greliny [132, 133]. Drugim możliwym regulatorem poziomu greliny w tym wypadku jest hormon produkowany przez komórki tkanki tłuszczowej – leptyna. Chociaż teoria ta mimo licznych badań nadal nie została w pełni potwierdzona [134].

Regulacja apetytu może być również uzależniona od stężenia greliny we krwi. W badaniach na zdrowych ludziach jednorazowe podanie 100µg greliny wywoływało atak głodu, natomiast podanie 4x50µg co godzinę nie wpływało na apetyt badanej grupy. W obu przypadkach dochodziło do wzrostu kortyzolu, hormonu wzrostu oraz prolaktyny [135].

Halem i wsp. wykorzystując w swoich badaniach BIM-28126, związek który jest całkowitym antagonistą receptora GHS-R1a zaobserwowali u szczurów, że zgodnie z przewidywaniami hamuje on indukowany greliną wyrzut hormonu wzrostu. Interesujący jest fakt, że okazał się on stymulować apetyt oraz sprzyjać wzrostowi masy ciała. Może to świadczyć, że grelina stymuluje apetyt i przyjmowanie pokarmu przez niepoznany dotąd receptor [136].

DZIAŁANIE OBWODOWE

1. FUNKCJA W PRZEWODZIE POKARMOWYM

Grelina podana obwodowo lub dokomorowo stymuluje, w sposób zależny od dawki, wydzielanie kwasu solnego i soku trzustkowego, przyspiesza opróżnianie żołądka oraz motorykę jelit. Ponadto, zwiększa w komórkach ilość hydrolaz lizosomalnych przygotowując je na przyjęcie składników pokarmowych [137,138]. Taki wpływ na motorykę przewodu pokarmowego jest raczej typowy dla motyliny, która strukturą bardzo przypomina grelinę. Ponadto, oba receptory dla tych hormonów charakteryzują się dużym podobieństwem

struktury. Nic więc dziwnego, że grelina w wysokich stężeniach wykazuje podobne właściwości do motyliny - stymuluje motorykę przewodu pokarmowego, indukując na czczo MMC (migrating motor complex), a po posiłku przyspiesza opróżnianie żołądka. Ponadto, grelina skraca czas przejścia płynnych pokarmów przez jelito cienkie. [121,139] Z kolei motylina, również w wysokich stężeniach, stymuluje wydzielanie hormonu wzrostu. Co ciekawe, *in vitro* na modelu zwierzęcym to krzyżowe działanie nie zostało potwierdzone. Przypuszcza się, że działanie greliny na motorykę przewodu pokarmowego odbywa się za pomocą swoistego receptora, a mediowane jest najprawdopodobniej przez nerw błędny, na powierzchni którego zidentyfikowano receptory dla greliny. Potwierdza to również fakt, że działanie to może zostać zahamowane przez wcześniejsze podanie atropiny lub wagoatomię. Zastosowanie blokerów receptora H₂ nie blokuje ww. efektu [140]. Z kolei u szczurów wykazano skuteczność greliny jako leku prokinetycznego w leczeniu gastroparezy [141].

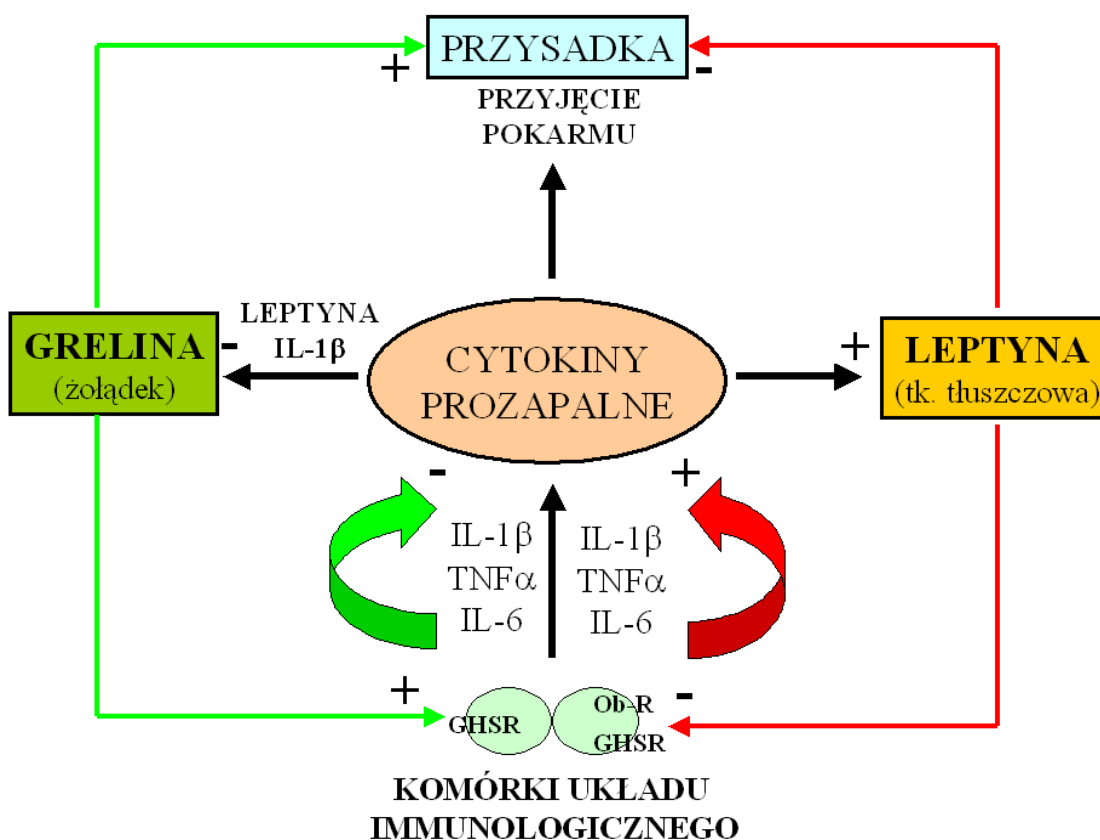
Ponadto, udowodniono protekcyjne działanie greliny na śluzówkę żołądka w eksperymencie w którym indukowano owrzodzenia błony śluzowej żołądka za pomocą etanolu [Sibilia i wsp 2003].

Badania na modelu zwierzęcym potwierdzają również możliwy udział greliny w ostrej fazie zapalenia śluzówki jelita. Zhao i wsp. wykazali znaczny wzrost ekspresji mRNA greliny i jej receptora w indukowanym za pomocą TNSB (trinitrobenzene sulfate) zapaleniu śluzówki jelita, co stanowi eksperymentalny model zwierzęcy choroby Leśniowskiego-Crohna. Udowodniono, że stymulacja receptora dla greliny aktywuje system globalnego mediatora stanu zapalnego NF- κ B/I κ B i prowadzi do zależnego od NF κ B wzrostu stężenia IL-8 w kolonocytach. Może to świadczyć o prozapalnym działaniu greliny w jelicie. Jak wykazały poprzednie badania aktywacja NF- κ B i wzrost ekspresji IL-8 są ściśle związane z patogenezą chorób zapalnych jelit [Grimm i wsp 1996; Jobin i Sartor 2000]. Wyniki te są niejako w sprzeczności z dotychczas opublikowanymi badaniami, które dowodziły protekcyjnego działania greliny na różne tkanki. Grelina, jak już opisano wcześniej, działała protekcyjnie na śluzówkę żołądka w eksperymencie w którym indukowano etanolem owrzodzenia błony śluzowej żołądka [Sibilia i wsp. 2003]. Działa również ochronnie na kardiomiocyty w indukowanym isoproterenolem uszkodzeniu mięśnia sercowego [Chang i wsp. 2004], zmniejszała rozległość ostrego zapalenia trzustki u szczurów [Dembiński i wsp. 2003]. Ta funkcja ochronna może być mediowana po przez stymulację wydzielania hormonu wzrostu - jak wykazano GH jest znanym czynnikiem redukującym stopień zapalenia zarówno w modelu zwierzęcym jak i u ludzi [Chen i wsp. 1997, Slonim i wsp. 2000], a brak GH u dzieci jest związany z zwiększoną zachorowalnością na choroby zapalne jelit [Ogura i wsp 1995].

Grelina może być również produkowana przez carcinoidy o lokalizacji jelitowej. Jest to ta grupa guzów, która do tej pory była uważana, że nie wydziela hormonów. Zastanawiający jest fakt, że nie zaobserwowano dotąd żadnych objawów klinicznych nadmiernego wydzielania greliny przez rakowiaka [142,143].

2. FUNKCJA W UKŁADZIE IMMUNOLOGICZNYM

Dixit i wsp. wykazali obecność GHSR na powierzchni limfocytów T oraz monocytów. Udowodniono, że grelina w ten właśnie sposób hamuje ekspresję prozapalnych cytokin, takich jak IL-1beta i IL-6, czy TNFalfa. Ponadto, grelina w zależności od dawki powodowała zahamowanie zależnej od leptyny produkcji cytokin prozapalnych. Z kolei leptyna powodowała wzrost ekspresji GHS-R na powierzchni komórek limfocytów T. Świadczy to o możliwości wpływania na układ immunologiczny zarówno przez grelinę jak i leptynę [144]. Asakawa i wsp. wykazali, że leptyna i IL-1beta hamują z kolei ekspresję greliny w żołądku (Rysunek 11) [145].



Rysunek 11. Hipotetyczny model wzajemnego oddziaływania układu endokrynnego i immunologicznego zaproponowany przez Dixit'a [144].

3. GRELINA A TKANKA TŁUSZCZOWA

Badania przeprowadzone przez Theander-Carrillo i wsp. wykazały, że działanie greliny w centralnym systemie nerwowym (CSN) może regulować metabolizm tkanki tłuszczowej. Autorzy podając dokomorowo w sposób ciągły grelinę zaobserwowali zwiększony wychwyt glukozy przez adipocyty, zwiększoną lipogenezę oraz zahamowanie oksydacji tłuszczu w białej tkance tłuszczowej. Z kolei w brunatnej tkance tłuszczowej dochodziło do zmniejszenia ekspresji białek mitochondrialnych związanych z termogenezą typu 1 i 3. Efekty te były zależne od dawki, występowały niezależnie od działania oreksygenicznego i najprawdopodobniej były mediowane przez układ sympatyczny [146].

Grelina może działać również na tkankę tłuszczową w sposób bezpośredni, przez obecny na powierzchni komórek adipocytów receptor GHS-R 1a, promując przyrost masy tkanki tłuszczowej. Z kolei grelina działając na komórki preadipocytów indukowała proliferację oraz różnicowanie tych komórek w kierunku dojrzałych adipocytów. Ponadto, hamowała również apoptozę komórek tkanki tłuszczowej pozbawionych działania czynników wzrostowych. Podobne działanie antyapoptotyczne grelina wykazywała w stosunku do kardiomiocytów oraz komórek endotelialnych naczyń. Działanie to było jednak mediowane przez dotychczas niezidentyfikowany receptor grelinowy [147].

Z kolei Zhang i wsp. zaobserwowali, że grelina zwiększa proliferację adipocytów, ale hamuje również ich różnicowanie. Możliwe, że przyczyną różnic w wynikach wyżej wymienionych prac było stężenie greliny. Jak udowodniono, w przeciwieństwie do dużych dawek, tylko małe dawki greliny okazały się stymulować różnicowanie komórek [148].

U gryzoni podanie greliny powoduje przyrost masy ciała. Efekt ten nie byłby tak zadziwiający, gdyby był odzwierciedlony w przyroście długości i/lub przynajmniej beztłuszczowej masy ciała, czego można by się spodziewać po stymulacji uwalniania GH. Wzrastająca ilość danych pozyskanych z badań na modelach zwierzęcych wyraźnie wskazuje, że przyrost masy ciała indukowany greliną, jest uwarunkowany przyrostem masy tkanki tłuszczowej, bez wpływu na wzrost szkieletu oraz, że dochodzi raczej do zmniejszenia niż do zwiększenia masy mięśniowej. Odkrycia te zostały potwierdzone nie tylko przez szereg grup badawczych, ale także zostały powtórzone przy wykorzystaniu syntetycznych agonistów receptora grelinowego (GHS-R), takich jak NNC 26-0161 (ipamorelina), GHRP-2 oraz GHRP-6. Zmiany w masie ciała gryzoni były możliwe do zaobserwowania już po 48 godzinach, a pod koniec drugiego tygodnia różnica była statystycznie istotna [149].

4. ODDZIAŁYWANIE GRELINA-LEPTYNA

Chociaż wiele dotychczas opublikowanych prac badało indywidualne działanie greliny oraz leptyny, to ich mechanizm wzajemnego oddziaływania nie jest nadal jasny. Barazzoni i wsp. wykazali ujemną korelację greliny i leptyny u szczurów [150]. Podobne wyniki, uzyskał Tschop i wsp. w badaniach w grupie szczupłych oraz otyłych ludzi. Wykonując pomiar składu ustroju za pomocą absorpcji promieniowania rentgenowskiego oraz pomiarów stężenia greliny i leptyny u kobiet i mężczyzn udowodnili wyższy poziom leptyny i niższy greliny w grupie otyłych ludzi oraz odwrotną sytuację gdy badani tracili na wadze w czasie głodowania. Autorzy postulują, że stan taki jest fizjologiczną adaptacją organizmu do otyłości [151]. Z kolei Toshinai i wsp. podając szczurom na czczo obwodowo leptynę zaobserwował wzrost stężenia greliny zarówno we krwi żyłnej jak i wzrost jej ekspresji w komórkach dna żołądka. W tym samym badaniu u myszy pozbawionych genu dla receptora leptynowego obserwowano niższy poziom greliny w porównaniu do grupy myszy z prawidłowym genem [152]. Z kolei Dube i wsp. oraz Beretta i wsp. obserwowali u szczurów wzrost stężenia greliny po centralnym podaniu leptyny z jednoczesnym zmniejszeniem apetytu. Grelina nie była w stanie również stymulować apetytu przy wysokim poziomie leptyny [153,154].

Reasumując, brak jest obecnie przekonujących dowodów jak wygląda wzajemne oddziaływanie greliny i leptyny u ludzi.

5. ORGANIZM POZBAWIONY GRELINY

Dorośle myszy pozbawione genu dla greliny miały adekwatny do wieku wzrost, apetyt, skład ustroju oraz prawidłowy rozród, bez jakichkolwiek zmian patologicznych. Być może jest to związane z procesem ewolucji gdzie głodowanie, a nie otyłość, jest czynnikiem decydującym o przeżyciu. Dlatego myszy pozbawione czynnika oreksygenicznego, w postaci greliny, nie miały zaburzeń w apetycie i rozwoju. Jednakże, myszy te wykazywały znacznie zredukowany wskaźnik oddechowy i tendencję do mniejszej ilości tkanki tłuszczowej gdy były karmione dietą o dużej zawartości tłuszczów. Może to świadczyć, że grelina nie jest kluczowym czynnikiem oreksygenicznym, a jedynie jej funkcja sprowadza się do dostosowania metabolizmu do potrzeb organizmu – na przykład wykorzystania glukozy zamiast tłuszczu. Jej brak zmniejsza podatność organizmu na otyłość spowodowaną nadmiarem tłuszczu w diecie. Jest to zgodne z obserwacjami z innych badań, w których podanie egzogennej greliny zmniejszało utylizację tłuszczu. Należy jednak zauważyć, że usunięcie innych czynników regulujących apetyt takich jak AgRP czy NPY metodami

genetycznymi również nie miało większego wpływu na apetyt, masę ciała czy parametry metaboliczne [155,156]. Z kolei inne rezultaty obserwowali Gropp i wsp. oraz Luquet i wsp. Ablacja genetyczna NPY/AgRP w neuronach jądra łukowego u dojrzałych myszy powodowała przewidywane zmniejszenie apetytu, natomiast nie obserwowano tego zjawiska u dojrzewających myszy, co mogłoby świadczyć o rozwinięciu mechanizmów kompensacyjnych w czasie rozwoju osobniczego [157,158].

W modelu zwierzęcym wykazano, że grelina ma mały wpływ na metabolizm energetyczny u dojrzałych zwierząt karmionych dietą o dużej zawartości tłuszczu. Natomiast może odgrywać kluczową rolę w regulacji metabolizmu energetycznego u dojrzewających osobników [159,160]. Pozostaje to w zgodzie z obserwacjami, że egzogenne podanie greliny w czasie rozwoju połączeń nerwowych u myszy nie ma wpływu na regulacje apetytu, natomiast bez żadnych przeszkód stymuluje wydzielanie hormonu wzrostu. Ciekawą obserwacją jest fakt że, codzienne podawanie myszom greliny, która stymuluje wydzielanie hormonu wzrostu, od pierwszego dnia po urodzeniu nie powoduje większego wzrostu myszy [nieopublikowane dane K.L. Grove i wsp.]

Z kolei myszy pozbawione genu dla receptora grelinowego nie wykazują typowego wzrostu poziomu hormonu wzrostu i wzrostu apetytu po podaniu greliny [161]. Myszy te mają jednak prawidłowy wzrost co świadczy, że receptor grelinowy nie jest kluczowym elementem regulacji wzrostu i apetytu. Jednakże, u myszy tych stężenie IGF-1 (insulin-like growth factor I) jest nieznacznie zmniejszone w porównaniu do grupy kontrolnej. Może to świadczyć, że grelina „przestawia” produkcję IGF-1 w celu podtrzymania procesów anabolicznych. Natomiast Zigman i wsp. wykazali, że myszy pozbawione genu dla receptora grelinowego GHSR, gdy były karmione dietą bogatą w tłuszcze, zarówno płci żeńskiej jak i męskiej spożywały mniej pokarmu, mniej odkładały tkanki tłuszczowej, preferencyjnie wykorzystywały tłuszcze jako substrat energetyczny i mniej przybywały na wadze w porównaniu do grupy kontrolnej. Różnice te wynosiły nawet 50%. Podobny efekt obserwowano u myszek płci żeńskiej pozbawionych receptora dla greliny karmionej zbilansowaną dietą. Efektu tego nie obserwowano u myszek płci męskiej. Myszy pozbawione receptora grelinowego miały również niższe stężenie glukozy przy braku zmian w poziomie insuliny. Ciekawą obserwacją autorów był spadek aktywność motorycznej myszek bez receptora GHSR o około 41,7% w porównaniu do grupy kontrolnej, mimo wzrostu wydatkowanej energii. Zaobserwowano również, wyższe stężenie leptyny w surowicy krwi u myszy pozbawionych genu dla receptora GHSR, co może również przyczyniać się do mniejszego apetytu i wzrostu wydatku energetycznego. Autorzy pracy zaproponowali teorię,

że GHSR jest receptorem odpowiedzialnym za krótkoterminowe działania greliny. Badania te dowodzą, że obecność greliny jest warunkiem koniecznym do fenotypowego rozwinięcia się powodowanej dietą otyłości. Rezultaty te są w sprzeczności z wynikami zaobserwowanych przez Sun i wsp. Różnice te mogą jednak wynikać z innej metodyki użytej w obu pracach. Z kolei wyniki Zigman i wsp. pokrywają się w dużym stopniu z otrzymanymi rezultatami badań Wortley'a i wsp. [162].

Tabela 3. Podsumowanie udowodnionych dotychczas funkcji greliny u ludzi [22].

Wydzielanie hormonów:	
• GH	↑
• ACTH	↑
• Kortyzol	↑
• PRL	↑
• TRH	↑? →
• LH	↑? →
• FSH	↑→
• Insulina	↑? ↓
Efekt anaboliczny:	
• Apetyt	↑
• Ilość tkanki tłuszczowej	↑
Układ sercowo-naczyniowy:	
• Objętość wyrzutowa mięśnia sercowego	↑
• Ciśnienie tętnicze	↓
• Apoptoza kardiomiocytów n vitro	↓
Funkcje żołądka:	
• Wydzielanie kwasu solnego	↑
• Motoryka żołądka	↑

↑ - zwiększa, ↓ - zmniejsza, → - bez wpływu

REGULACJA WYDZIELANIA GRELINY W CHOROBIE

Grelina bierze udział w regulacji wielu fizjologicznych procesów zachodzących w organizmie, dlatego nie dziwi fakt ogromnego zainteresowania tym peptydem w patogenezie różnych chorób. Jedną z głównych funkcji greliny jest regulacja apetytu, dlatego też próbuje się wyjaśnić jej rolę w powstawaniu otyłości, a co za tym idzie łączy się z nią wielkie nadzieje na opracowanie skutecznej terapii.

1. GRELINA A OTYŁOŚĆ

Stężenie greliny jest statystycznie znamienne mniejsze w grupie otyłych ludzi w porównaniu do grupy ludzi o prawidłowej masie ciała [163,164,165,166]. Badania dowodzą, że zwiększona ilość tkanki tłuszczowej w otyłości powoduje zmiany ilościowe i jakościowe cytokin prozapalnych takich jak TNF α , IL-6, angiotensynogen, PAI-1. Jak już wcześniej wspomniano grelina, ale także adiponektyna oraz rezystyna biorą udział w regulacji wydzielania prozapalnych cytokin, których niższe stężenie obserwuje się w otyłości [167].

Z kolei interesujący jest fakt, że leptyna w grupie otyłych ludzi nie powoduje zmniejszenia głodu ze względu na oporność ośrodków podwzgórzowych na leptynę (Banks i wsp. 1996). Opierając się na tych obserwacjach można przypuszczać, że zmniejszenie stężenia greliny w surowicy krwi u otyłych ludzi, w podobnym mechanizmie, nie wystarczy do redukcji apetytu. W grupie otyłych ludzi obserwowano również zakłócenie fizjologicznego, nocnego wzrostu stężenia greliny. Podobny efekt występował u ludzi pozbawionych snu [168,169]. Z kolei English i wsp. wykazali w swoich badaniach, że grelina nie spada po posiłku u ludzi otyłych, co może być wynikiem zmniejszenia stężenia tego hormonu na czczo w tej grupie ludzi [170].

Obserwuje się dwa rodzaje polimorfizmu w genie kodującym grelinę: Arg51Gln oraz Leu72Met [171,172,173,174]. Te dwie mutacje znajdowały się w obrębie egzonu 2 i zmieniały sekwencję aminokwasową cząsteczki preprogreliny. Częstość występowania polimorfizmu była podobna zarówno w grupie kontrolnej jak i w grupie ludzi otyłych. Jednak w grupie otyłych ludzi z allelem Met72 otyłość występowała wcześniej w porównaniu do homozygot. Z kolei mutacja Arg51Gln powoduje zaburzenie procesu powstawania 28-aminokwasowej greliny. Efektem tej mutacji jest nieaktywna biologicznie 94-aminokwasowa preprogrelina. Ten rodzaj polimorfizmu występował z częstością ok. 6,3% tylko w grupie otyłych ludzi. U kobiet będących nosicielkami tej mutacji masa ciała była

znacznie niższa niż w grupie osób nie będących nosicielami tej mutacji. Z kolei odmienne wyniki do wyżej opisanych uzyskali Hinney A i wsp. Stwierdzili oni brak zależności pomiędzy obecnością polimorfizmu Arg51Gln i Leu72Met, a występowaniem otyłości w badanych grupach [175].

2. GRELINA W RÓŻNYCH CHOROBYCH GÓRNEGO ODCINKA PRZEWODU POKARMOWEGO

Stężenie greliny u pacjentów z wykrytą infekcją *Helicobacter pylori* było statystycznie istotnie mniejsze w porównaniu do grupy pacjentów u których takiej infekcji nie stwierdzono. U pacjentów tych zaobserwowano zmniejszoną ekspresję mRNA preprogreliny, zmniejszenie zawartości greliny w komórkach oraz zmniejszenie ilości samych komórek X/A. Udowodniono, że eradykacja *Helicobacter pylori* powoduje zwiększenie apetytu i przyrost masy ciała, co wydają się być właśnie związane ze wzrostem ilości komórek produkujących grelinę jak i wzrostem wydzielania samej greliny [176,177,178]. Z kolei badania Gokcel i wsp. wykazały, że infekcja *Helicobacter pylori* nie ma wpływu na stężenie greliny w osoczu [179,180]. Natomiast Osawa i wsp. stwierdzili, że zmiany w poziomie greliny w surowicy krwi przed i po eradykacji były odwrotnie proporcjonalne do zmian masy ciała oraz do wyjściowego poziomu greliny, a nie pozostawały w żadnym związku z wielkością produkcji greliny w żołądku [181].

Ponadto, nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w stężeniu greliny wśród grup pacjentów z chorobami górnego odcinka przewodu pokarmowego takimi jak: ostre/przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka, z łagodnymi polipami żołądka, GERD (gastrointestinal reflux disease), wrzodami żołądka/dwunastnicy czy rakiem żołądka. Z kolei wśród chorych bez infekcji *Helicobacter pylori* obserwowano statystycznie istotne różnice w stężeniu greliny. I tak chorzy z przewlekłym zapaleniem błony śluzowej żołądka oraz chorobą wrzodową żołądka mieli najniższe stężenie greliny. Pacjenci z ostrym zapaleniem błony śluzowej żołądka mieli najwyższe stężenie greliny w surowicy krwi. Również zasięg zapalenia błony śluzowej żołądka był odwrotnie proporcjonalny do stężenia greliny w surowicy krwi [182].

3. GRELINA A CHOROBY ZAPALNE JELIT

W badaniach przeprowadzonych przez Nishi i wsp. nie zaobserwowano różnic w poziomie greliny w grupie osób z rozpoznanymi chorobami zapalnymi jelit oraz w grupie kontrolnej zdrowych ludzi. Nie stwierdzono również statystycznie istotnej zależności

pomiędzy poziomem greliny, a lokalizacją choroby. Grupa badana była jednak niewielka, a wszyscy pacjenci znajdowali się w stadium remisji [183].

4. GRELINA A INNE CHOROBY

Stężenie greliny jest znacznie podwyższone u pacjentów z jadłowstrętem psychicznym. Może to tłumaczyć wysokie stężenie hormonu wzrostu u tych ludzi. Jak już wspomniano, grelina stymuluje również wydzielanie ACTH, prolaktyny i kortyzolu, co może tłumaczyć brak miesiączki i zaburzenia w zachowaniu w tej grupie pacjentów [184].

Z kolei w zespole Prader-Willi, charakteryzującym się opóźnieniem w rozwoju psychicznym, nadmiernym apetytem, niskim wzrostem i osłabieniem mięśni, obserwuje się również podwyższone stężenie greliny: ok. 3-4-krotnie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej. Jedną z postulowanych przyczyn tego zespołu jest utrata jednego lub więcej genów regionu q11-13 chromosomu 15. To może tłumaczyć część z występujących objawów, ale nadal nie jest jasne co powoduje tak wysoki poziom greliny [185,186]. Z kolei w zespole krótkiego jelita obserwuje się obniżone stężenie greliny w surowicy krwi [187].

GRELINA A NOWOTWORY

Obecnie zidentyfikowano receptory GHS-R dla greliny na powierzchni komórek takich nowotworów jak: rak piersi, płuca, trzustki, prostaty, nowotworów stromalnych przewodu pokarmowego oraz nowotworów złośliwych przysadki. W większości badań autorzy obserwowali, że grelina w różnym stopniu może wpływać na proliferację ww. komórek [188,189,190,191,192]. Ponadto, Gaytan i wsp. wykazali obecność receptora GHS-R na powierzchni komórek jajników i jąder oraz potwierdzili obecność tych receptorów na powierzchni komórek nowotworowych wywodzących się z tych narządów [193]. Z kolei w opublikowanej w ostatnich miesiącach pracy, Zhigang i wsp. wykazali również obecność tego receptora na powierzchni nowotwór złośliwych przewodu pokarmowego tj. rak przełyku, żołądka, okrężnicy oraz odbytnicy [194].

Cassoni i wsp. badali obecność oraz funkcję receptora GHS-R na powierzchni komórek linii komórkowej raka piersi zależnych (MCF7 i T47D) oraz niezależnych od estrogenów (MDA-MB231). Do tego celu wykorzystali stworzony przez siebie ligand receptora GHS-R znakowany radioizotopem. Zaobserwowali brak przyłączania się ligandu do prawidłowych komórek oraz komórek włókniakogrzuczołka piersi. Obserwowali natomiast wysokie powinowactwo ligandu do komórek raka piersi w stopniu zależnym od zróżnicowania (G1-G3). Ponadto, podanie greliny wywoływało zahamowanie proliferacji tych komórek *in vitro* [195]. W badaniach innych nowotworów, Jeffery i wsp. obserwowali stymulując proliferacji komórek raka prostaty *in vitro* pod wpływem greliny [196]. Duxbury i wsp. wykazali, że grelina w wysokich stężeniach hamowała proliferację komórek raka trzustki *in vitro* [191]. Z kolei, Murata i wsp. obserwowali dwukrotne przyspieszenie proliferacji komórek linii komórkowej wątrobiaka spowodowane wpływem greliny, a w populacji ludzi otyłych, niski poziom greliny był związany z wyższym ryzykiem raka gruczołowego przełyku [197, 198].

Ostatnie badania wykazały również, że forma greliny pozbawiona kwasu oktanylowego w miejscu trzeciej seryny, może odgrywać rolę w powstawaniu nowotworów. Z kolei nowotwory wrażliwe na grelinę mogą nie posiadać obecnie znanego receptora GHSR-1a. Może to świadczyć o obecności na ich powierzchni dotychczas niezidentyfikowanego receptora grelinowego. Wykazano, że właśnie ten typ receptora może pośredniczyć w zahamowaniu zależnej od dawki proliferacji komórek raka płuc przez IGF-II. Rolę jaką odgrywa grelina w procesie powstawania nowotworu jest jednak nadal niejasna.

GRELINA A KACHEKSJA NOWOTWOROWA

Kacheksja jest jednym z najczęstszych efektów wpływu nowotworu na organizm. Jest często utożsamiana z złą prognozą i może odpowiadać za ok. 20% zgonów z powodu nowotworów złośliwych [199]. Wzrost stężenia greliny obserwuje się w kacheksji nowotworowej u pacjentów z rakiem płuca oraz prostaty [200].

W badaniach Wolf'a i wsp. u pacjentów z rakiem piersi i jelita grubego, gdzie kacheksja była definiowana jako 5% spadek masy ciała w ciągu ostatnich 6 miesięcy, wykazano proporcjonalną zależność stężenia greliny w surowicy krwi oraz wielkości spadku masy ciała w ciągu ostatnich 6 miesięcy ($r=0,5$; $p=0,001$). Poziom greliny był statystycznie istotnie wyższy u pacjentów z kacheksją w porównaniu do grupy pacjentów z tym samym nowotworem ale bez obserwowanego spadku masy ciała. Analiza pod względem płci ujawniła istnienie statystycznie istotnej różnicy jedynie w grupie kobiet [201].

Stężenie acylowanej greliny jak i stosunek acylowanej do desacylowanej greliny był statystycznie istotnie zwiększony w grupie osób z kacheksją wywołaną nowotworem w porównaniu do grupy kontrolnej bez nowotworu oraz w porównaniu z grupą z rozpoznaniem nowotworem ale bez kacheksji. Apetyt, mierzony za pomocą wizualnej skali analogowej, nie był zwiększony. Autorzy uważają, że wzrost stężenia acylowanej greliny był prawdopodobnie wywołany mechanizmem kompensującym spadek masy ciała. Z kolei kacheksja może być wynikiem oporności na grelinę, ponieważ, jak wynika z badań, wzrostowi stężenia greliny nie towarzyszy wzrost apetytu [202]. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że podanie greliny chorym z kacheksją nowotworową wywoływało 30% wzrost apetytu i spożycia energii. Świadczyłoby to o tym, że oporność jest jedynie częściowa. Badacze postulują, że podobnie jak w cukrzycy typu 2 insulinooporność może zostać przełamana dzięki dużym dawką insuliny, to również w tym przypadku zwiększenie dawki greliny może spowodować wzrost apetytu [203].

Intensywne badania nad wykorzystaniem greliny w leczeniu kacheksji nowotworowej znajdują się obecnie w drugiej fazie badań klinicznych [204].

GRELINA A PATOGENEZA RAKA JELITA GRUBEGO

Jak już wspomniano w poprzednich rozdziałach, szeroka dystrybucja greliny i jej receptora przemawia za jej wielokierunkowym działaniem. Hormon ten jest uważany za najsilniejszy z dotychczas poznanych stymulatorów hormonu wzrostu, wpływa na krótkoterminową regulację apetytu, regulację metabolizmu energetycznego organizmu w aspekcie długoterminowym, posiada wpływ na homeostazę glukozy, na układ immunologiczny, proliferację komórek czy motorykę przewodu pokarmowego. Dlatego też grelina może stanowić jedno z ogniw łączących różne czynniki ryzyka RJG (jelitowe, dietetyczne i epidemiologiczne) w logiczną całość. Rysunek 12 przedstawia szereg udowodnionych czynników zwiększających i zmniejszających ryzyko rozwoju raka jelita grubego. Obecnie brak jest opublikowanych badań, które jednoznacznie udowodniłyby udział greliny w patogenezie tego nowotworu. Dotychczasowe prace wskazują jednak, że hormon ten może uczestniczyć w regulacji każdego z tych czynników.



Rysunek 12. Udowodnione czynniki zwiększające/zmniejszające ryzyko raka jelita grubego [205].

Jednym z takich czynników jest między innymi otyłość i związane z nią zaburzenia wydzielania hormonów między innymi regulujących przyjmowanie i metabolizm pokarmów: leptyny, adiponektyny, insuliny oraz właśnie greliny [206,207].

Grelina, w sposób zależny od dawki, wpływa również na motorykę przewodu pokarmowego przyspieszając opróżnianie żołądka oraz motorykę samych jelit. Jak wykazały badania, przedłużony czas pasażu pokarmu przez przewód pokarmowy może sprzyjać rozwojowi raka jelita grubego [208,209].

Innym z udowodnionych czynników mogących promować rozwój raka jelita grubego jest insulinooporność. Powoduje ona, że kolonocyty wystawione są przez długi czas na podwyższone stężenie insuliny, glukozy, triglicerydów, niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych oraz IGF-1, które są z kolei postulowanymi czynnikami biorącymi udział w patogenezie nowotworów. Może to prowadzić do zaburzenia wzrostu, rozwoju oraz homeostazy tych komórek, co z kolei może promować rozwój nowotworu. Jak zostało udowodnione insulina stymuluje proliferację nabłonka jelita grubego w sposób bezpośredni oraz pośredni, zwiększając stężenie IGF-1 oraz zmniejszając stężenie białek wiążących IGF [210, 211, 212, 213]. Dodatkowo, udowodniono, że na powierzchni komórek raka jelita grubego występuje zwiększona ekspresja receptora dla IGF-1 [214]. Istnieje wiele dowodów przemawiających za istnieniem ujemnego sprzężenia pomiędzy greliną, a insuliną. Ponadto, przewlekłe podawanie syntetycznych GHS u dorosłych ludzi powodowało hiperglikemię oraz promowało insulinooporność [215].

Z kolei Jurimae i wsp. wykazali, że regularna aktywność fizyczna może mieć wpływ na poziom greliny w surowicy krwi. Osoby, które regularnie uprawiały sport miały wyższe średnie stężenie greliny w surowicy krwi w porównaniu do grupy nieaktywnej fizycznie [216].

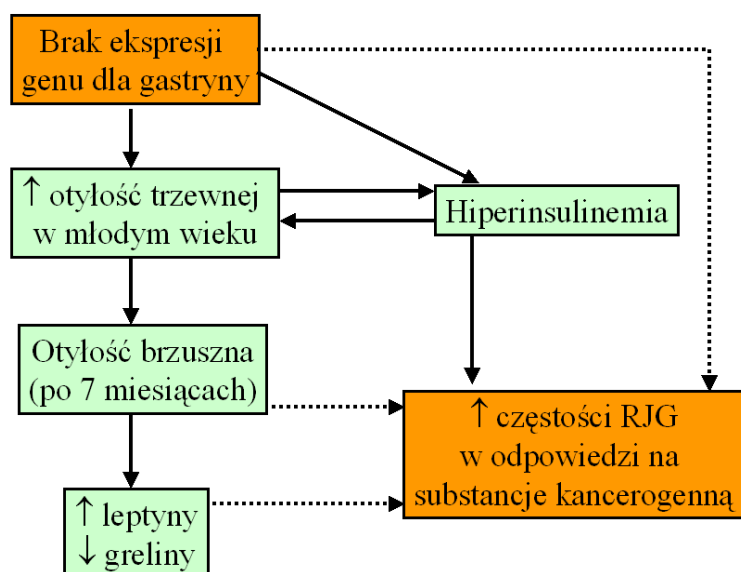
Grelina jest jednym z najsilniejszych stymulatorów wydzielania hormonu wzrostu, pośrednio mając również wpływ na tkankowy biomediator IGF-1. Badania wykazały, że GH przyczynia się w sposób bezpośredni oraz pośredni (przez IGF-1) do wzrostu nowotworu. U pacjentów z akromegalią obserwowano zwiększoną częstość raka piersi oraz jelita grubego [217, 218,219]. Ponadto, zmiany rakowe u pacjentów z tą jednostką chorobową charakteryzują się bardziej agresywnym przebiegiem oraz większą tendencją do przerzutowania w porównaniu do zmian rakowych w populacji ogólnej [220,221]. Ponadto, podwyższony poziom GH i IGF-1 jest związany z wyższym ryzykiem wystąpienia zmian nowotworowych [222]. Hormony te są silnymi mitogenami komórek nowotworowych przyspieszając cykl komórkowy oraz hamując apoptozę [223]. Dlatego też, grelina, jako

hormon stymulujący wydzielanie GH, może mieć swój udział pośredni i/lub bezpośredni w patogenezie nowotworów. Z kolei substancje hamujące wydzielanie hormonu wzrostu okazały się skuteczne w modelach zwierzęcych w zmniejszaniu rozmiarów takich guzów jak osteosarkoma, rak nerki, trzustki, prostaty, piersi, jajnika czy właśnie jelita grubego [224,225,226,227,228].

Co raz więcej badań dowodzi również, że wspomniany już wcześniej hormon leptyna, której zwiększone stężenie w surowicy obserwuje się w otyłości, odgrywa rolę w rozwoju RJG. U homozygotycznych myszy z uszkodzonym receptorem leptynowym obserwowano zwiększoną liczbę zmian nowotworowych w porównaniu do myszy heterozygotycznych lub z prawidłowym receptorem u których farmakologicznie indukowano RJG [229]. Za udziałem leptyny w karcynogenezie RJG przemawiają również przeprowadzone w Szwecji prospektywne badania dotyczące ludzi. Dowiodły one, że podwyższone stężenie leptyny w surowicy krwi jest czynnikiem ryzyka RJG u mężczyzn. Wykazano także, że leptyna *in vitro* może stymulować proliferację komórek raka jelita grubego. W wielu procesach, między innymi regulacji apetytu, wpływu na tkankę tłuszczową, odpowiedzi immunologicznej, wykazano antagonistyczne działanie greliny w stosunku do leptyny [230, 231].

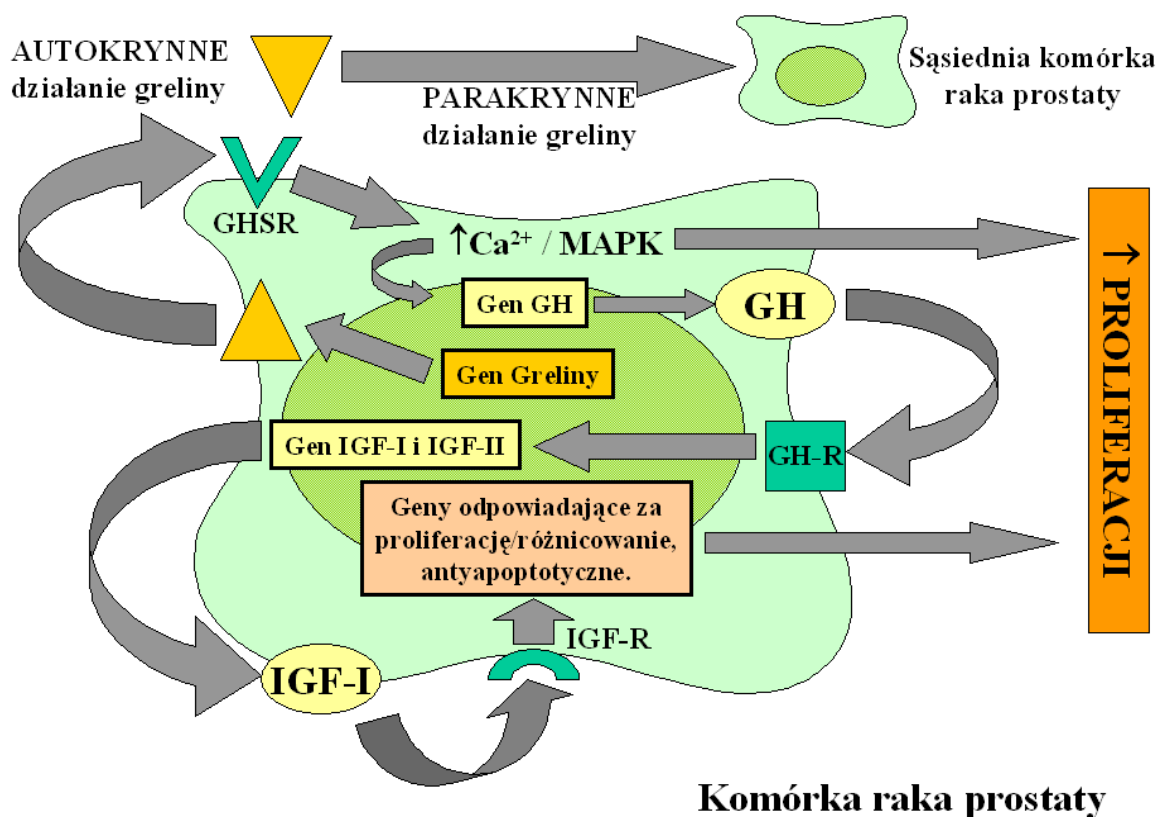
Inny hormon, adiponektyna, produkowany przez tkankę tłuszczową, może również odgrywać rolę w patogenezie raka jelita grubego. Jej działanie powoduje redukcję ekspresji mRNA dla czynnika TGFbeta1, którego podwyższone stężenie obserwuje się w RJG wywołanego farmakologicznie u szczurów [232,233]. Inne badania wykazały stymulujący wpływ izoform adiponektyny na proliferację oraz jej prozapalne działanie na komórki błony śluzowej jelita, co jak uważają autorzy, może odgrywać rolę między innymi w patogenezie RJG [234]. Z kolei wykazano, że grelina zmniejsza ekspresję adiponektyny oraz działa mitogenicznie i antyapoptotycznie w stosunku do samych komórek tkanki tłuszczowej [235, 236].

Cowey i wsp., opierając się na swoich badaniach, zaproponowali hipotetyczny model karcynogenezy raka jelita grubego na modelu zwierzęcym u myszy pozbawionych genu dla gastryny, gdzie jednym z zaproponowanych czynników mogących mieć wpływ na patogenezę RJG jest zmniejszający się poziom greliny w surowicy krwi (Rysunek 13) [237]. Ponadto, w warunkach fizjologicznych grelina może wpływać na poziom gastryny poprzez swój stymulujący wpływ na wydzielanie polipeptydu trzustkowego oraz somatostatyny [238].



Rysunek 13. Hipotetyczny model karcynogenezy RJG u myszy pozbawionych genu gastryny [237].

Możliwy jest także jej bezpośredni wpływ na proces karcynogenezy. Sugeruje się, że grelina może stymulować kinazę MAP [239], której zwiększoną aktywację obserwuje się między innymi w komórkach raka jelita grubego [240]. Obecnie udowodniono, że właśnie tą drogą grelina stymuluje proliferację komórek raka prostaty oraz piersi in vitro (Rysunek 14) [241].



Rysunek 14. Potencjalny mechanizm działania systemowej/lokalnej greliny na komórki raka prostaty/piersi. Grelina może wywoływać endogenne wydzielanie hormonu wzrostu w komórkach prostaty/piersi co z kolei wyzwała autokrynną produkcję i wydzielanie IGF-1 i IGF-II lub po aktywację MAP kinazy [241].

W badaniach przeprowadzonych przez zespół Jeffery i wsp. wykazano obecność izoformy progreliny, nie posiadającej transkryptu z trzeciego eksonu, w stężeniach dużo większych w linii komórkowej raka prostaty w porównaniu do prawidłowych komórek. Podanie greliny zwiększało proliferację linii komórek raka prostaty PC-3 o 33%. Zaobserwowano również brak transkryptu GHS-R 1b na poziomie białkowym, gdy transkrypt ten był obecny na poziomie mRNA w linii komórek raka prostaty [241]. W komórkach raka prostaty zidentyfikowano amplifikację na chromosomie 3q25-27, która koreluje z progresją guza [242]. Ciekawe jest to, że właśnie w tym miejscu zlokalizowany jest gen dla greliny oraz jej receptora. Podobna amplifikacja została zaobserwowana przez Sugita i wsp. w guzach szyjki macicy oraz jajnika [243].

Z kolei Zhigang i wsp. wykazali również obecność receptora GHS-R na powierzchni komórek raka jelita grubego. W przypadku komórek nowotworowych poziom jego ekspresji był znacznie wyższy w porównaniu do ekspresji tego receptora na powierzchni prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego. Może to świadczyć o możliwości bezpośredniego wpływu

greliny na komórki nowotworowe. Ponadto, autorzy stwierdzili odwrotnie proporcjonalną zależność ekspresji receptora GHS-R w stosunku do stopnia zaawansowania TNM oraz stopnia zróżnicowania komórek raka jelita grubego [194].

Badania te przemawiają za możliwym pośrednim i/lub bezpośrednim udziałem greliny w procesach karcynogenezy raka jelita grubego. Mimo stale i szybko rosnącej ilości publikacji dotyczących greliny, brak jest obecnie badań szczegółowo analizujących przydatność oznaczenia stężenia greliny oraz jego zmian w surowicy krwi pacjentów z rakiem jelita grubego. Dlatego też wydaje się celowe pogłębienie wiedzy na temat roli greliny i jej możliwym udziale w patogenezie raka jelita grubego.

III. ZAŁOŻENIA PRACY; HIPOTEZA BADAWCZA

Przedstawione we wstępie informacje dotyczące wydzielania greliny oraz jej mechanizmów działania pozwoliły na sformułowanie poniższych założeń pracy oraz hipotezy badawczej.

Założenia pracy:

- Otyłość oraz dieta bogata w tłuszcze są udowodnionymi czynnikami ryzyka raka jelita grubego. Grelina jest jednym z kluczowych hormonów regulujących apetyt oraz metabolizm energetyczny organizmu.
- Przedłużony czas pasażu pokarmu przez przewód pokarmowy może sprzyjać rozwojowi raka jelita grubego. Grelina w sposób zależny od dawki wpływa na motorykę przewodu pokarmowego przyspieszając opróżnianie żołądka oraz motorykę samych jelit.
- Insulinooporność jest jednym z udowodnionych czynników promujących rozwój raka jelita grubego. Istnieje wiele dowodów przemawiających za istnieniem ujemnego sprzężenia pomiędzy greliną a insuliną.
- Grelina jest najsilniejszym z dotychczas poznanych stymulatorów hormonu wzrostu. Udowodniono, że GH może przyczyniać się w sposób bezpośredni lub pośredni (przez IGF-1) do wzrostu nowotworu. Ponadto wykazano, że u ludzi z wysokim poziomem hormonu wzrostu rak jelita grubego przebiega w sposób bardziej agresywny.
- Grelina pozostaje w antagonistycznym działaniu w stosunku do leptyny w różnych procesach w organizmie. Podwyższone stężenie leptyny jest udowodnionym czynnikiem ryzyka RJG u mężczyzn, a jej działanie *in vitro* stymuluje proliferację komórek raka jelita grubego.
- Grelina zmniejsza ekspresję adiponektyny, która, jak wykazały badania, może w sposób pośredni lub bezpośredni uczestniczyć w patogenezie raka jelita grubego.
- W komórkach raka jelita grubego obserwuje się zwiększoną aktywację kinazy MAP. Obecnie udowodniono, że właśnie tą drogą grelina stymuluje proliferację komórek raka prostaty i piersi *in vitro*.

- Poziom ekspresji receptora GHS-R na powierzchni komórek raka jelita grubego jest odwrotnie proporcjonalny w stosunku do stopnia zaawansowania TNM oraz stopnia zróżnicowania komórek raka jelita grubego i jest znacznie wyższy w porównaniu do ekspresji tego receptora na powierzchni prawidłowych komórek nabłonka jelita grubego.
- Istnieją dowody na udział greliny w karcynogenezie innych nowotworów zależnych od hormonów tj. rak piersi, endometrium, prostaty, a także trzustki i przełyku.

Hipoteza badawcza:

Na podstawie przytoczonych powyżej obserwacji i wyników badań można przypuszczać, że grelina może być pierwotnym lub wtórnym czynnikiem ryzyka rozwoju raka jelita grubego, a jej stężenie i/lub zmiany stężenia w surowicy krwi różnią się pomiędzy grupa osób zdrowych oraz z rakiem jelita grubego.

IV. CEL PRACY

Celem podjętego badania była ocena przydatności oznaczenia stężenia greliny w surowicy krwi u chorych z rakiem jelita grubego poprzez:

1. Porównanie stężenia greliny na czczo pacjentów z rakiem jelita grubego oraz osób zdrowych, zarówno w grupie kobiet jak i mężczyzn
2. Porównanie stężenia greliny na czczo przed oraz w 7. dobie po zabiegu operacyjnym w grupie osób z rakiem jelita grubego
3. Ocena korelacji stężenia greliny na czczo z wybranymi parametrami oceniającymi stan odżywienia pacjentów z rakiem jelita grubego:
 - współczynnikiem masy ciała BMI
 - całkowitą liczbą limfocytów
 - poziomem białka i albumin w surowicy krwi oraz
 - procentową zawartością tkanki tłuszczowej w organizmie
4. Ocena wpływu zabiegu operacyjnego na poziom greliny na czczo w 7. dobie po zabiegu operacyjnym pacjentów z rakiem jelita grubego
5. Porównanie wpływu doustnego podania długołańcuchowych kwasów tłuszczowych na stężenie greliny w grupie kobiet i mężczyzn z rakiem jelita grubego oraz osób zdrowych
6. Ocena korelacji stężenia greliny z poziomem antygenu karcynoembrionalnego (CEA) oraz stężeniem leptyny na czczo w surowicy krwi
7. Porównanie stężenia greliny z różną lokalizacją guzów ustaloną na podstawie badań obrazowych – kolonoskopia i/lub tomografia komputerowa
8. Porównanie stężenia greliny z wynikami badań histo-patologicznych: stopniem zaawansowania pTNM, stopniem zaawansowania wg klasyfikacji Astlera-Collera w modyfikacji Dukes'a oraz stopniem zróżnicowania nowotworu.

V. MATERIAŁ I METODYKA PRACY

MATERIAŁ:

Do badań zakwalifikowano 47 chorych z RJG oraz 37 zdrowych osób stanowiących grupę kontrolną. Tabela 4 przedstawia cechy populacyjne, mikroskopowe i kliniczne grupy chorych z rakiem jelita grubego (Grupa 1). Z kolei w tabeli 5 przedstawiono cechy populacyjne i kliniczne grupy kontrolnej (Grupa 2). W grupie 1, mężczyźni stanowili 48,9%, a kobiety 51,1% przypadków. Najmłodszy chory liczył 36 lat, najstarszy 85 lat; średni wiek wyniósł 68,1 lat. W grupie drugiej mężczyźni stanowili 43,3%, natomiast kobiety 56,7% przypadków. Najmłodsza osoba miała 22 lata, a najstarsza 67 lat; średni wiek wyniósł 40,4 lat. W grupie 47 pacjentów z RJG pełny protokół badania przeprowadzono u 31 chorych (16 mężczyzn oraz 15 kobiet), a u pozostałych 16 pacjentów (7 mężczyzn i 9 kobiet) z powodów techniczno-metodologicznych wykonano pobranie krwi na czczo przed operacją oraz w 7. dobie po zabiegu operacyjnym.

We wszystkich przypadkach w pooperacyjnym badaniu histo-patologicznym potwierdzono utkanie raka gruczołowego z przewagą raka z średnim stopniem zróżnicowania (G2) - 63,8% przypadków. Raki o wysokim stopniu zróżnicowania (G1) stanowiły 21,3%, natomiast o niskim stopniu zróżnicowania (G3) stanowiły 14,9% przypadków. Obecność komórek raka gruczołowego śluzotwórczego stwierdzono w 40,4% przypadków.

Dominowała lokalizacja w odbytnicy - 40,4% przypadków. 23,4% raków lokalizowało się w esicy, w kątnicy 17%, zstępnicy 10,6%, wstępnicy 8,5% oraz w poprzecznicy 2,1%. U jednego pacjenta stwierdzono guz synchroniczny zlokalizowany zarówno w odbytnicy jak i kątnicy.

W ocenie pooperacyjnej przeważały przypadki pT4 stanowiące 61,7% materiału, pT3 stanowiły 10,6%, pT2 17,1%, a pT1 10,6%. U 26 pacjentów (55,3%) nie stwierdzono przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych (pN0). U 10 (21,3%) stwierdzono przerzuty w 1-3 węzłach chłonnych. Z kolei u 11 osób (23,4%) stwierdzono powyżej 3 węzłów zmienionych przerzutowo (Tabela 6).

U 95,7% pacjentów zabieg był radykalny makroskopowo i mikroskopowo. W dwóch przypadkach (4,3%) RJG był nieoperacyjny ze względu na zaawansowanie miejscowe. W obu przypadkach z powodu nacieku na kreskę jelita cienkiego wykonano zespolenie omijające.

Tabela 4. Cechy populacyjne, mikroskopowe i kliniczne 47 chorych z RJG

Cechy populacyjne, mikroskopowe i kliniczne	Liczba chorych	%
Płeć:		
• Kobiety	24	51,1
• Mężczyźni	23	48,9
Wiek (lata) ± OS	68,1 ± 12,5	
Waga (kg) ± OS	68,7 ± 12,1	
Wzrost (cm) ± OS	167,0 ± 7,9	
BMI (kg/m ²) ± OS	24,6 ± 4,1	
Procentowa zawartość tkanki tłuszczowej (%) ± OS	27,7 ± 8,6	
Całkowita liczba limfocytów ± OS [tys/μl]	1,7 ± 0,7	
Lokalizacja guza:		
• Kątnica	8	17
• Wstępnica	4	8,5
• Poprzecznicza	1	2,1
• Zstępnica	5	10,6
• Esica	11	23,4
• Odbytnica	19	40,4
Stopień zróżnicowania raka:		
• G1	10	21,3
• G2	30	63,8
• G3	7	14,9
Zaawansowanie miejscowe (pT):		
• pT1	5	10,6
• pT2	8	17,1
• pT3	5	10,6
• pT4	29	61,7
Stan mikroskopowy regionalnych węzłów chłonnych (pN):		
• N0	26	55,3
• N1	10	21,3
• N2	11	23,4
Zaawansowanie wg pTNM:		
• I°	12	25,5
• II°	16	34,1
• III°	19	40,4
Stopniem zaawansowania RJG wg klasyfikacji Dukesa w modyfikacji Astlera i Collera:		
• A1	3	6,4
• B1	12	25,5
• B2	10	21,3
• C1	0	0
• C2	20	42,6
• D1	2	4,2
Rak śluzowotwórczy:		
• Obecne komórki raka śluzowotwórczego	19	40,4
• Brak komórek raka śluzowotwórczego	28	59,6
Razem	47	100,0
OS – odchylenie standardowe		

Tabela 5. Cechy populacyjne oraz kliniczne 31 osób grupy kontrolnej.

Cechy populacyjne i kliniczne	Liczba chorych	%
Płeć		
• Kobiety	21	56,7
• Mężczyźni	16	43,3
Wiek (lata) ± OS	40,4 ± 13,35	
Waga (kg) ± OS	66,7 ± 12,5	
Wzrost (m) ± OS	1,72 ± 0,1	
BMI (kg/m ²) ± OS	22,3 ± 2,6	
% zawartość tkanki tłuszczowej ± OS	15,9 ± 5,8	
OS – odchylenie standardowe		

Tabela 6. Zaawansowanie guza (pT) oraz stan mikroskopowy regionalnych węzłów chłonnych (pN) w grupie 47 chorych na RJG.

pT/pN	pN0	pN1	pN2	Razem
pT1	5	0	0	5
pT2	8	0	0	8
pT3	3	0	2	5
pT4	10	10	9	29
Razem	26	10	11	47

I stopień

II stopień

III stopień

METODYKA PRACY:

Badanie było przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego, zgodnie z wytycznymi Deklaracji Helsińskiej z uwzględnieniem poprawek i uzupełnień z roku 2000. Do badania zostali zakwalifikowani pacjenci z potwierdzonym w przedoperacyjnym badaniu histopatologicznym rakiem jelita grubego, spełniający poniższe kryteria włączenia oraz wyłączenia.

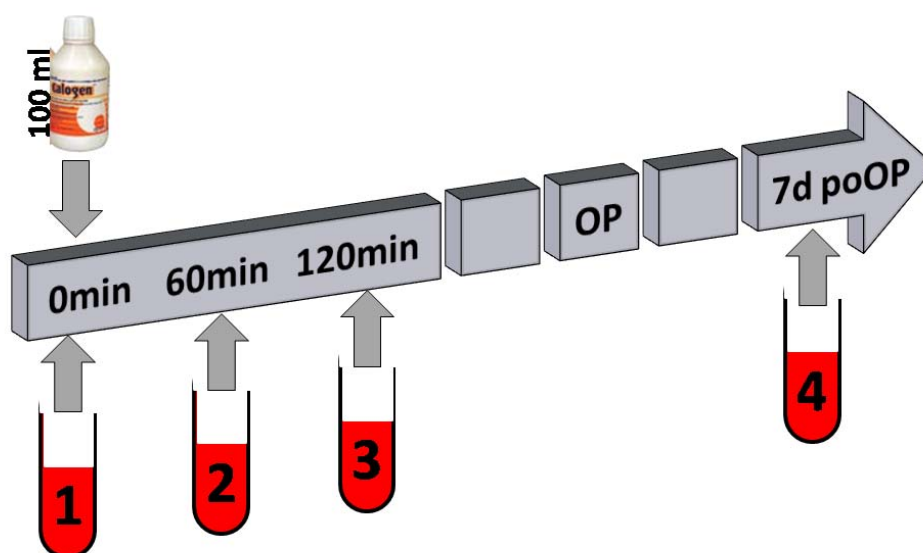
Kryteria włączenia:

- Wiek ≥ 18
- Rozpoznany w przedoperacyjnym badaniu histopatologicznym rak jelita grubego

Kryteria wykluczenia:

- Wiek < 18 r.ż.
- Odległe przerzuty
- Obecność drugiego nowotworu o innej budowie histologicznej
- Przypadki raka jelita grubego operowane w trybie doraźnym
- Wcześniejsze operacje przewodu pokarmowego za wyjątkiem usunięcia wyrostka robaczkowego oraz pęcherzyka żółciowego
- Cukrzyca niezależnie od typu
- Choroby układowe
- Nadczynność/niedoczynność tarczycy określana jako stężenie TSH poza granicami normy
- Schorzenia wątroby definiowane jako wzrost enzymów wątrobowych dwukrotnie powyżej normy
- Niewydolność nerek określana jako poziom mocznika i kreatyniny poza granicami normy
- Niewydolność serca definiowana jako frakcja wyrzutowa $< 35\%$ w badaniu echokardiograficznym.
- Terapia eradykacyjna *Helicobacter pylori* w czasie ostatnich 3 miesięcy
- Uzależnienie od alkoholu / leków
- Schorzenia psychiatryczne
- Choroby hematologiczne
- Aktywna infekcja (objawy infekcji i/lub gorączka $> 38,3^{\circ}\text{C}$)
- Stosowanie sterydów, leków hormonalnych, substancji pobudzających apetyt

Zakwalifikowani do badań pacjenci byli proszeni o spożycie normalnej kolacji w przeddzień przyjęcia do szpitala, nie spożywanie żadnych napojów alkoholowych i nie wykonywanie żadnego nadmiernego wysiłku oraz aby w dniu przyjęcia pozostać na czczo. Badanie rozpoczynało się pomiędzy godziną 7.00 a 8.00. Krew pobierana była z zakładanego rutynowo w trakcie przyjęcia do szpitala wkłucia dożylnego, zgodnie z wszystkimi standardami i normami bezpieczeństwa stosowanymi w III Klinice Chirurgii Ogólnej UJ CM. Pierwsza próbka pobierana była na czczo (12h bez pokarmu). Materiał do badań był częściowo uzyskany z resztek krwi pobieranej do rutynowych badań diagnostycznych w trakcie przyjęcia do szpitala oraz w trakcie pobytu pacjenta w oddziale. W sumie w pierwszej fazie badania gromadzono 4 próbki od każdego pacjenta: przed podaniem mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych ($t=-60\text{min}$), godzinę później ($t=0$) oraz dwukrotnie w odstępach jednogodzinnych ($t=+60$, $+120\text{min}$). W drugiej fazie badania zrezygnowano z pierwszego oznaczenia poziomu greliny z powodu braku różnic w wynikach grupy pilotażowej w czasie $t=-60$ oraz $t=0$. Po pobraniu drugiej próbki ($t=0$) proszono pacjentów o wypicie 100ml gotowej mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (Calogen, SHS International Ltd, Liverpool, UK) – rysunek 16. Skład emulsji oraz profil długołańcuchowych kwasów tłuszczowych przedstawia tabela 7. Napój musiał być wypity w ciągu 5 min. Dodatkowo pobierano na czczo jedną próbkę krwi w siódmej dobie po zabiegu operacyjnym.



Rysunek 15. Graficzna prezentacja czasu pobrania krwi oraz podania mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (szczegółowy opis w tekście).

Krew do oznaczenia poziomu greliny i leptyny była pobierana do próbek zawierających Na₂EDTA (1mg/ml) oraz aprotyninę (500U/ml), a następnie wirowana przez 15min (1600g). Otrzymane osocze przechowywano do czasu analizy w temperaturze -60°C.

Tabela 7. Skład emulsji Collagen oraz profil długołańcuchowych kwasów tłuszczowych.

Skład emulsji Collagen	w 100 ml	Profil kwasów tłuszczowych g / 100g	
Energia [kJ]	1850	C12:0	<1
[kcal]	450	C14:0	<1
Białka [g]	-	C16:0	10
Węglowodany [g]	-	C18:0	3
Tłuszcze [g]	50	C18:1	58
Nasycone [g]	9,6	C18:2	20
Jednonienasycone [g]	28,2	C18:3	<1
Wielonienasycone [g]	10	C20:0	1
Błonnik [g]	-	C20:1	1
		C22:0	3
		C24:0	1

Do pomiaru stężenia greliny w surowicy krwi był wykorzystany dostępny komercyjnie zestaw RIA firmy Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, California, USA). Przeciwciała skierowane były przeciw C-końcowemu fragmentu peptydu, co umożliwia oznaczenie całkowitej greliny (acylowanej oraz desacylowanej formy). Do pomiaru poziomu leptyny wykorzystywano dostępny komercyjnie zestaw ELSIA firmy Biosource Europe S.A. (Belgia).

Wszyscy uczestnicy w dniu badania byli ważeni oraz mierzeni. Oceniano również stan odżywienia wykorzystując wskaźnik BMI, poziom białka, albumin i całkowitą liczbę limfocytów we krwi oraz pomiar zawartości procentowej tkanki tłuszczowej. Do pomiaru procentowej zawartości tkanki tłuszczowej wykorzystywano metodę analizy bioelektrycznej oporności (impedancji) za pomocą urządzenia Omron BF302 (Omron Healthcare Europe). Wykonywano 3 kolejne pomiary, z których wyciągano średnią arytmetyczną. Pozostałe badania (stężenia białka, albumin, całkowitą liczbę limfocytów, przedoperacyjny poziom antygenu karcynoembrionalnego) były wykonywane w ramach standardowego protokołu przygotowania pacjentów do zabiegu chirurgicznego w Laboratorium Diagnostycznym Szpitala Miejskiego Specjalistycznego im. G. Narutowicza w Krakowie.

Po zakwalifikowaniu wszyscy chorzy badanej grupy byli operowani. U 3 pacjentów (6,4%) wykonano wycięcie miejscowe w technice TEM (Transanal Endoscopic Microsurgery), u 12 pacjentów (25,5%) hemikolektomię prawostronną, u 6 pacjentów (12,8%) hemikolektomię lewostronną, u 8 pacjentów (17,0%) sigmoidektomię, u 12

pacjentów (25,5%) niską przednią resekcją odbytnicy, kolektomię u 3 pacjentów (6,4%), z kolei u jednego pacjenta wykonano międzyzwieraczową resekcję odbytnicy. U wszystkich ww. pacjentów zabieg był radykalny makroskopowo i mikroskopowo. W dwóch przypadkach (4,3%) rak był nieoperacyjny ze względu na zaawansowanie miejscowe. W obu przypadkach z powodu nacieku na kreskę jelita cienkiego wykonano zespolenie omijające (Tabela 8).

Tabela 8. Typ wykonanej operacji w grupie 47 chorych na RJG.

Typ wykonanej operacji	Liczba chorych	%
- Wycięcie miejscowe w technice TEM	3	6,4
- Hemikolektomia prawostronna	12	25,5
- Hemikolektomia lewostronna	6	12,8
- Sigmoidektomia	8	17,0
- Przednia niska resekcja odbytnicy	12	25,5
- Kolektomia	3	6,4
- Zespolenie omijające	2	4,3
- Międzyzwieraczowa resekcja odbytnicy	1	2,1

Ostateczne rozpoznanie, stopień zaawansowania (pTNM), stopień zaawansowania wg klasyfikacji Dukesa w modyfikacji Astlera-Collera oraz stopień zróżnicowania nowotworu był ustalany na podstawie wyniku pooperacyjnego badania histopatologicznego przeprowadzonego w Zakładzie Histopatologii Szpitala Miejskiego Specjalistycznego im. G. Narutowicza w Krakowie.

Wyniki badań były zapisywane w specjalnie do tego celu stworzonej bazie danych zgodnie ze wszystkimi regułami bezpieczeństwa przechowywania poufnych danych.

VI. ANALIZA STATYSTYCZNA

W opisie wyników badania wykorzystano jednostki numeryczne (wiek, waga, stężenie greliny, leptyny, całkowita liczba limfocytów, stężenie białka, albumin, CEA w surowicy krwi, całkowita zawartość tkanki tłuszczowej wyrażona w procentach). Parametry ilościowe zostały wyrażone jako wartość średnia \pm odchylenie standardowe. Pozostałe przypadki zostały zakodowane wykorzystując liczby arabskie.

Dane był analizowane za pomocą pakietu Statistica 6.0 (StatSoft). Test W Shapiro-Wilka oraz test Kołmogorova-Smirnowa z poprawką Lilliefors'a wykorzystywano do weryfikacji normalności rozkładu otrzymanych wyników. Zmiany stężenia greliny przed i po podaniu mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych oraz w 7. dobie po zabiegu operacyjnym były analizowane za pomocą testu ANOVA z powtarzanymi pomiarami. Pozostałe wyniki w zależności od wyniku rozkładu normalności były analizowane za pomocą innych testów parametrycznych oraz nieparametrycznych.

Hipotezę zerową (H_0) odrzucano na ustalonym poziomie $\alpha=0,05$.

VII. WYNIKI

GRUPA KONTROLNA

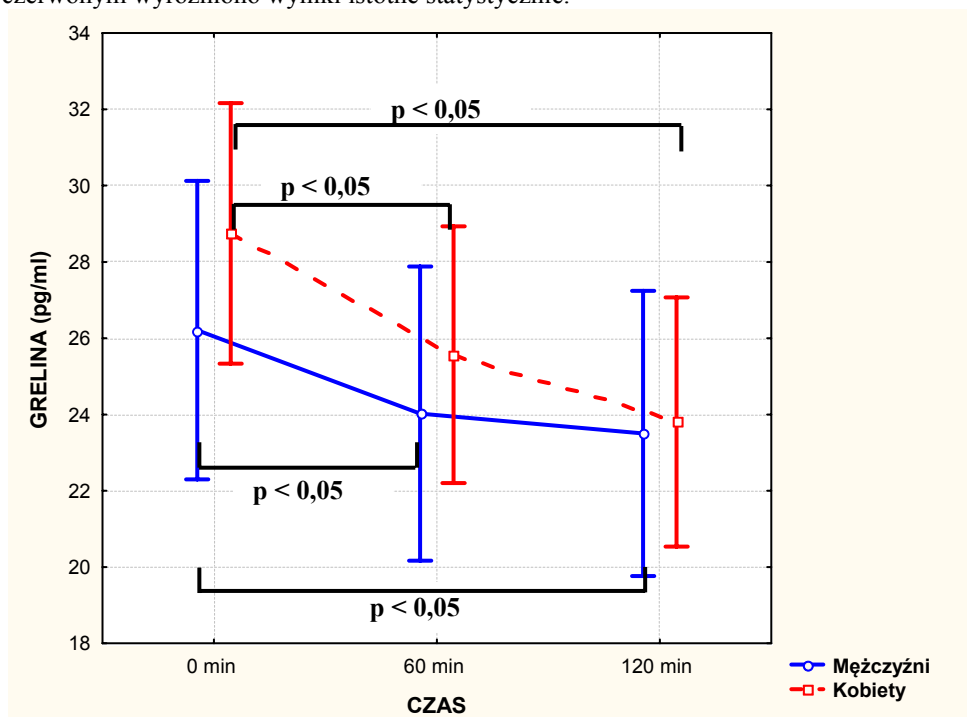
Wykorzystując test ANOVA z powtarzanymi pomiarami stwierdzono zarówno w grupie kontrolnej kobiet jak i mężczyzn statystycznie istotny spadek średniego stężenia greliny zarówno 60 min oraz 120 min po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (odpowiednio $p=0,001$ i $p=0,01$ oraz $p<0,001$ i $p<0,001$).

Wykorzystując test t-studenta dla prób niezależnych (zmienne miały rozkład normalny) nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w stężeniu greliny pomiędzy grupą kontrolną kobiet oraz mężczyzn zarówno na czczo ($28,7$ vs $26,2$ pg/ml; $p=0,3$) oraz 60 min ($25,6$ vs $24,0$ pg/ml; $p=0,5$) i 120 min ($23,8$ vs $23,5$ pg/ml; $p=0,9$) po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych – tabela 9 i rysunek 16.

Tabela 9. Średnie stężenie greliny na czczo oraz po doustnym podaniu mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych \pm odchylenie standardowe [pg/ml] w grupie zdrowych kobiet i mężczyzn.

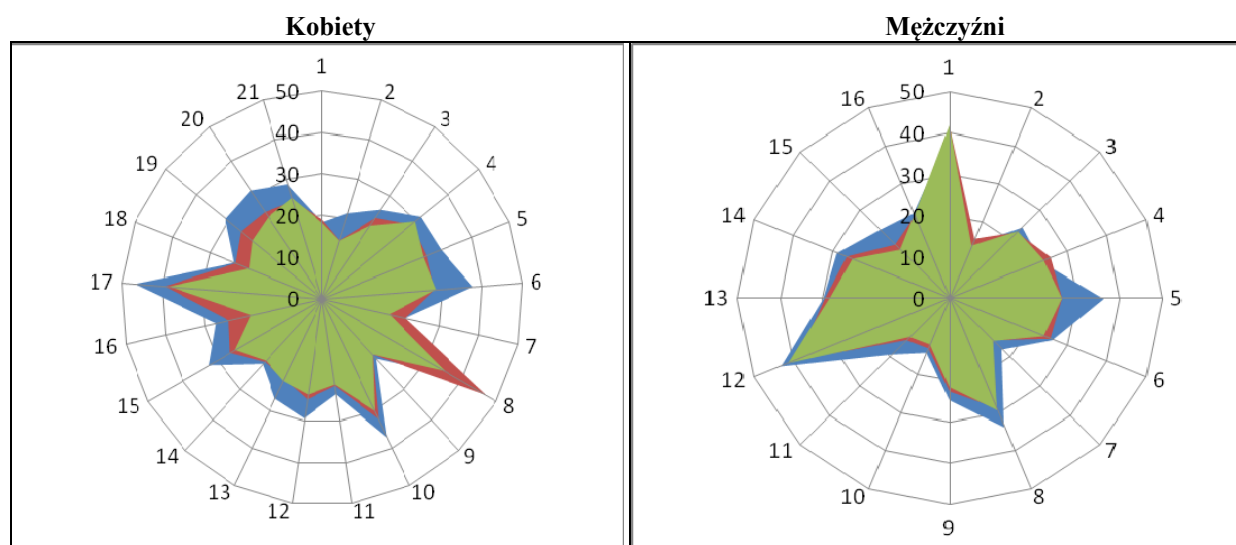
	0 min	60 min	120 min	P value
Wszyscy	27,7 \pm 7,7	24,9 \pm 7,5	23,7 \pm 7,3	< 0,001*
Kobiety	28,7 \pm 7,1	25,6 \pm 7,1	23,8 \pm 6,0	< 0,001*
Mężczyźni	26,2 \pm 8,5	24,0 \pm 8,2	23,5 \pm 8,9	< 0,001*

*Kolorem czerwonym wyróżniono wyniki istotne statystycznie.



Rysunek 16. Wykres przedstawiający średnie stężenie greliny (oraz 95% przedział ufności) na czczo oraz 60 i 120 min po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie zdrowych mężczyzn i kobiet.

Poniżej przedstawiono wykres radarowy przedstawiający zmiany stężenia greliny poszczególnych osób grupy kontrolnej na czczo (warstwa niebieska) oraz po 60 min (warstwa czerwona) i 120 min (warstwa zielona) od podania 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie zdrowych mężczyzn i kobiet. Wykres ten bardzo dobrze odzwierciedla stężenie greliny poszczególnych osób w grupie kobiet i mężczyzn, które zmniejsza się (warstwa zielona, obrazująca stężenie greliny po 120 min od podania mieszaniny kwasów tłuszczowych, w większości przypadków „nie przykrywa” warstwy niebieskiej, obrazującej stężenie greliny na czczo) – rysunek 17.



Rysunek 17. Wykres radarowy przedstawiający zmiany stężenia greliny na czczo (warstwa niebieska) oraz 60 (warstwa czerwona) i 120 min (warstwa zielona) po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych poszczególnych osób w grupie kontrolnej mężczyzn i kobiet.

Z kolei tabela 10 przedstawia procentowy udział podgrup składających się z osób u których stężenie greliny wzrosło, spadło lub nie zmieniło się po 60 i 120 min po doustnym przyjęciu mieszaniny kwasów tłuszczowych w stosunku do stężenia wyjściowego (na czczo) zarówno w grupie zdrowych kobiet i mężczyzn.

Tabela 10. Procentowy udział podgrup składających się z osób u których stężenie greliny wzrosło, spadło lub nie zmieniło się po 60 i 120 min po doustnym przyjęciu mieszaniny kwasów tłuszczowych w stosunku do stężenia wyjściowego (na czczo) zarówno w grupie zdrowych kobiet i mężczyzn.

	Po 60 min	Po 120 min
Kobiety	↑ 9,5 %	↑ 0 %
	↔ 4,8 %	↔ 0 %
	↓ 85,7 %	↓ 100%
Mężczyźni	↑ 18,75 %	↑ 12,5 %
	↔ 0 %	↔ 0 %
	↓ 81,25 %	↓ 87,5 %

↑ - wzrost stężenia greliny; ↓ - spadek stężenia greliny; ↔ - brak zmian stężenia greliny

Przeprowadzono również analizę korelacji stężenia greliny na czczo z masą ciała, wzrostem oraz procentową zawartością tkanki tłuszczowej. Wykazała ona statystycznie istotną ujemną korelację stężenia greliny na czczo z masą ciała wyrażoną w kilogramach. Nie zaobserwowano istotnej statystycznie korelacji stężenia greliny z wiekiem oraz procentową zawartością tkanki tłuszczowej (Tabela 11).

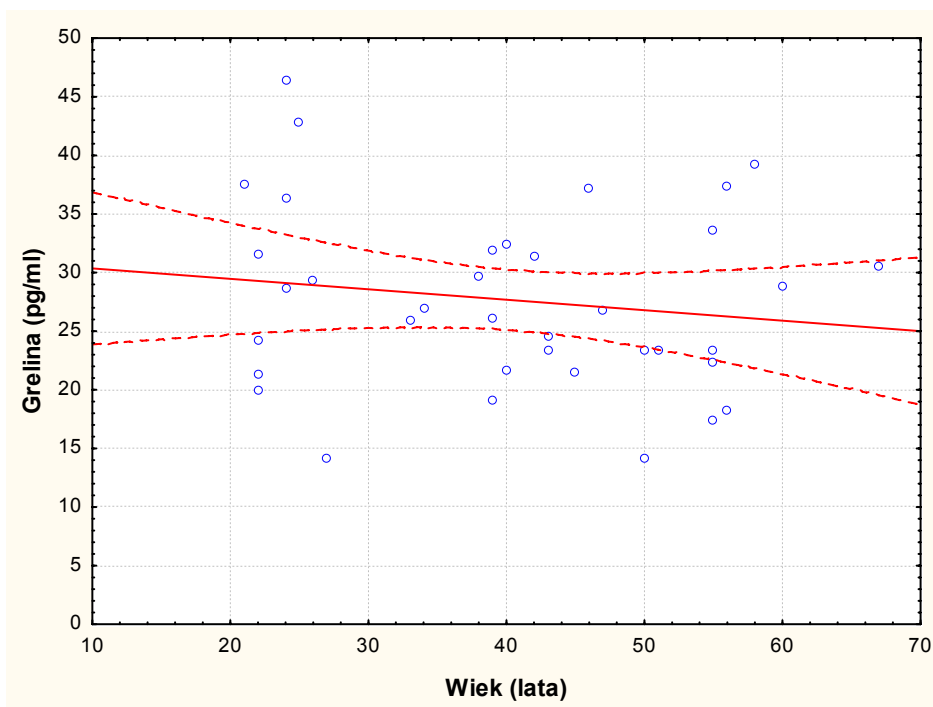
Tabela 11. Analiza korelacji stężenia greliny na czczo z wybranymi parametrami stanu odżywienia.

Parametry	R	R ²	P
Wiek	0,15	0,023	0,36
Waga	-0,43	0,18	0,009*
Wzrost	-0,17	0,03	0,3
% zawartość tkanki tłuszczowej	-0,16	0,03	0,35

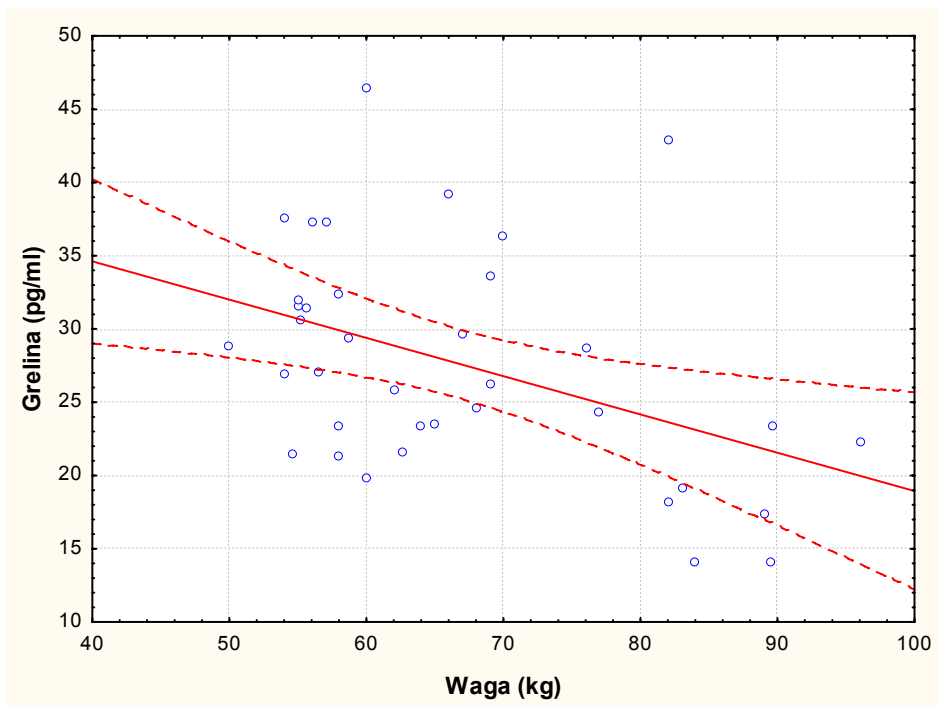
R – współczynnik korelacji, R² – współczynnik determinacji.

*Kolorem czerwonym wyróżniono wyniki istotne statystycznie.

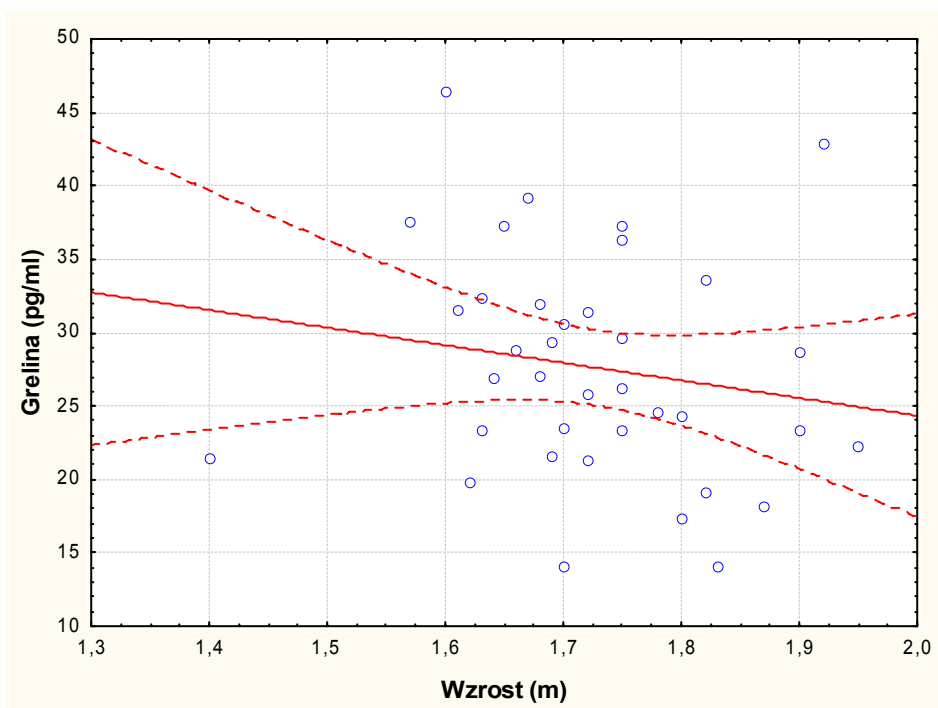
Rysunek 18-21 przedstawiają graficzną formę ww. wyników



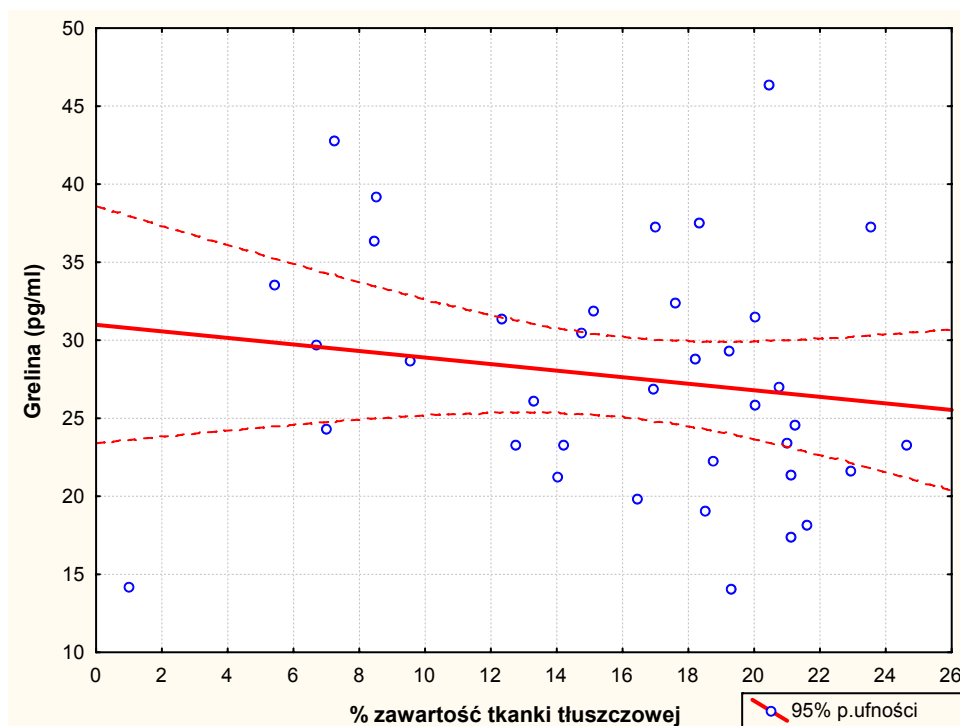
Rysunek 18. Korelacja stężenia greliny na czczo z wiekiem wyrażonym w latach.



Rysunek 19. Korelacja stężenia greliny na czczo z wagą wyrażoną w kilogramach.



Rysunek 20. Korelacja stężenia greliny na czczo z wzrostem wyrażonym w metrach



Rysunek 21. Korelacja stężenia greliny na czczo z % zawartością tkanki tłuszczowej w organizmie

GRUPA PACJENTÓW Z RJG

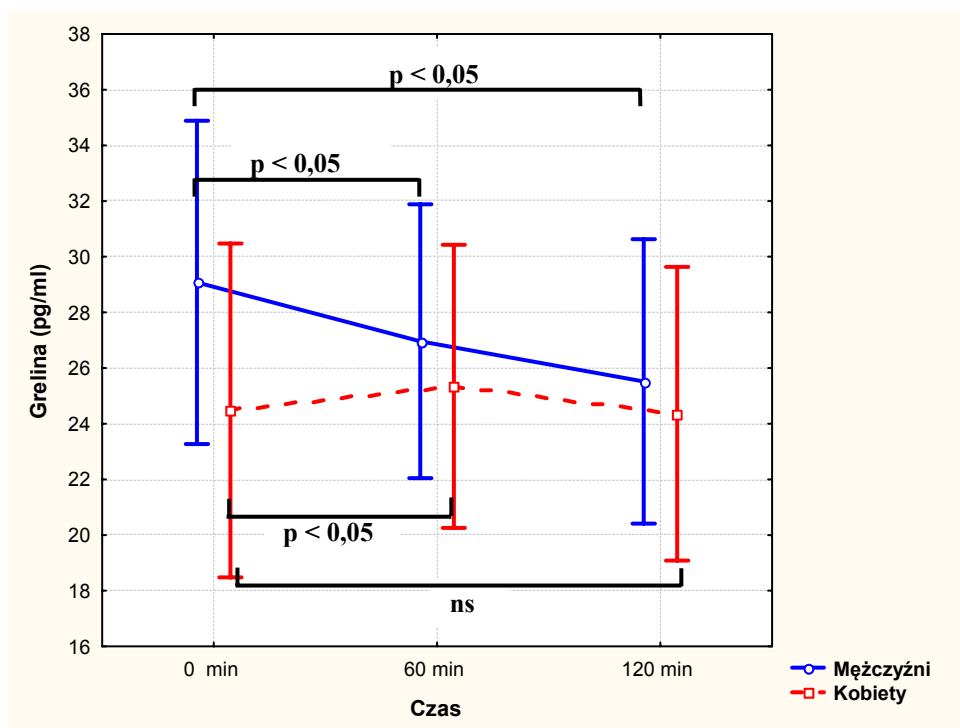
Wykorzystując test ANOVA z powtarzanymi pomiarami w grupie mężczyzn z RJG obserwowano statystycznie istotny spadek średniego stężenia greliny zarówno po 60 min ($p=0,03$) jak i 120 min po doustnym podaniu 100ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych ($p=0,009$). W grupie kobiet z rakiem jelita grubego takiego spadku nie obserwowano ($p=0,08$) – tabela 12 oraz rysunek 22.

Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w stężeniu greliny pomiędzy grupą kobiet i mężczyzn z rakiem jelita grubego zarówno na czczo (24,5 vs 29,1 pg/ml; $p=0,3$) oraz 60 min (25,3 vs 27,0 pg/ml; $p=0,6$) i 120 min (24,4 vs 25,5 pg/ml; $p=0,7$) po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych.

Tabela 12. Średnie stężenie greliny na czczo oraz po doustnym podaniu mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych \pm odchylenie standardowe [pg/ml] w grupie kobiet i mężczyzn z RJG

	0 min	60 min	120 min	P value
Wszyscy	26,85 \pm 11,4	26,2 \pm 9,5	24,9 \pm 9,8	0,01
Kobiety	24,5 \pm 6,4	25,3 \pm 6,2	24,4 \pm 6,3	0,08
Mężczyźni	29,1 \pm 14,5	27,0 \pm 12,0	25,5 \pm 12,5	0,009

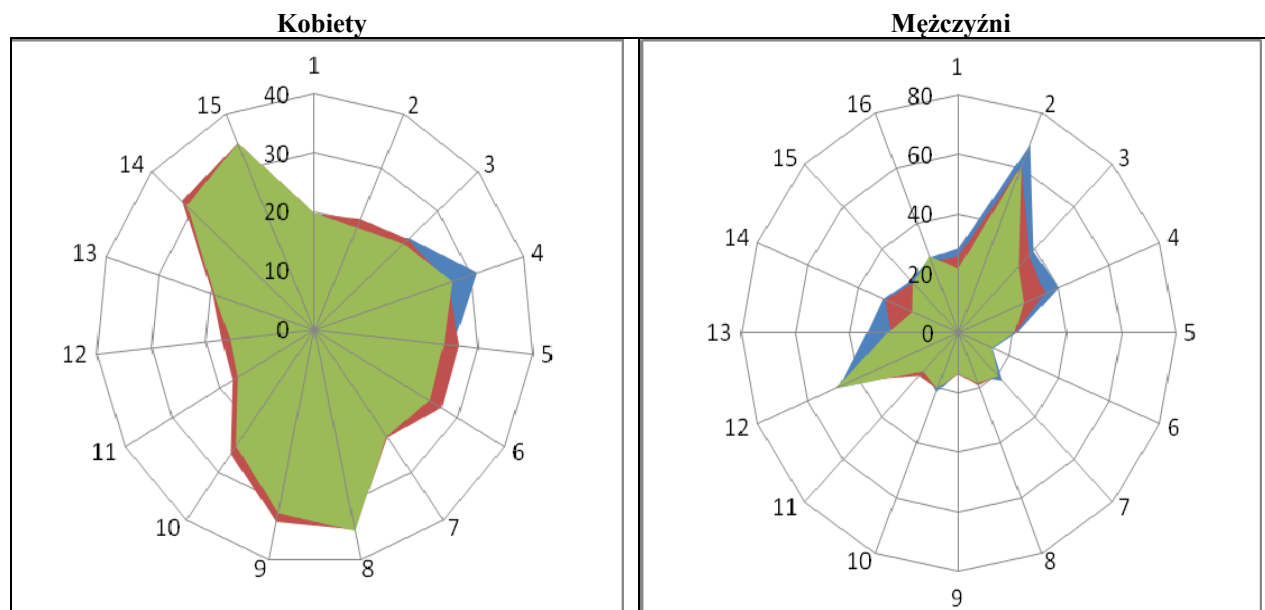
*Kolorem czerwonym wyróżniono wyniki istotne statystycznie.



Rysunek 22. Wykres przedstawiający średnie stężenie greliny (oraz 95% przedział ufności) na czczo oraz 60 i 120 min po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie mężczyzn i kobiet z RJG.

Poniżej przedstawiono wykres radarowy przedstawiający zmiany stężenia greliny w surowicy krwi poszczególnych pacjentów na czczo (warstwa niebieska) oraz 60 min (warstwa czerwona) i 120 min (warstwa zielona) po podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie mężczyzn i kobiet z RJG. Wykres ten bardzo dobrze odzwierciedla stężenie greliny, które w grupie mężczyzn zmniejsza się (warstwa zielona, obrazująca stężenie greliny po 120 min od podania mieszaniny kwasów tłuszczowych, w większości przypadków „nie przykrywa” warstwy niebieskiej, obrazującej stężenie greliny na czczo). Z kolei w grupie kobiet z RJG warstwa zielona, obrazująca stężenie greliny na czczo, jest praktycznie całkowicie przesłonięta przez pozostałe warstwy, obrazujące stężenie greliny po 60 i 120 min od podania mieszaniny kwasów tłuszczowych – rysunek 23.

Z kolei tabela 13 obrazuje procentowy udział podgrup składających się z osób u których stężenie greliny wzrosło, spadło lub nie zmieniło się po 60 i 120 min po doustnym przyjęciu mieszaniny kwasów tłuszczowych w stosunku do stężenia wyjściowego (na czczo) zarówno w grupie kobiet i mężczyzn z RJG.



Rysunek 23. Wykres radarowy przedstawiający zmiany stężenia greliny na czczo (warstwa niebieska) oraz 60 (warstwa czerwona) i 120 min (warstwa zielona) po podaniu 100 ml mieszanki długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie mężczyzn i kobiet z RJG.

Tabela 13. Procentowy udział podgrup składających się z osób u których stężenie greliny wzrosło, spadło lub nie zmieniło się po 60 i 120 min po doustnym przyjęciu mieszanki kwasów tłuszczowych w stosunku do stężenia wyjściowego (na czczo) zarówno w grupie kobiet i mężczyzn z RJG.

	Po 60 min	Po 120 min
Kobiety	↑ 86,7 % ↔ 0 % ↓ 13,3 %	↑ 53,3 % ↔ 6,7 % ↓ 40%
Mężczyźni	↑ 18,75 % ↔ 18,75 % ↓ 62,5 %	↑ 25 % ↔ 12,5 % ↓ 56,25 %

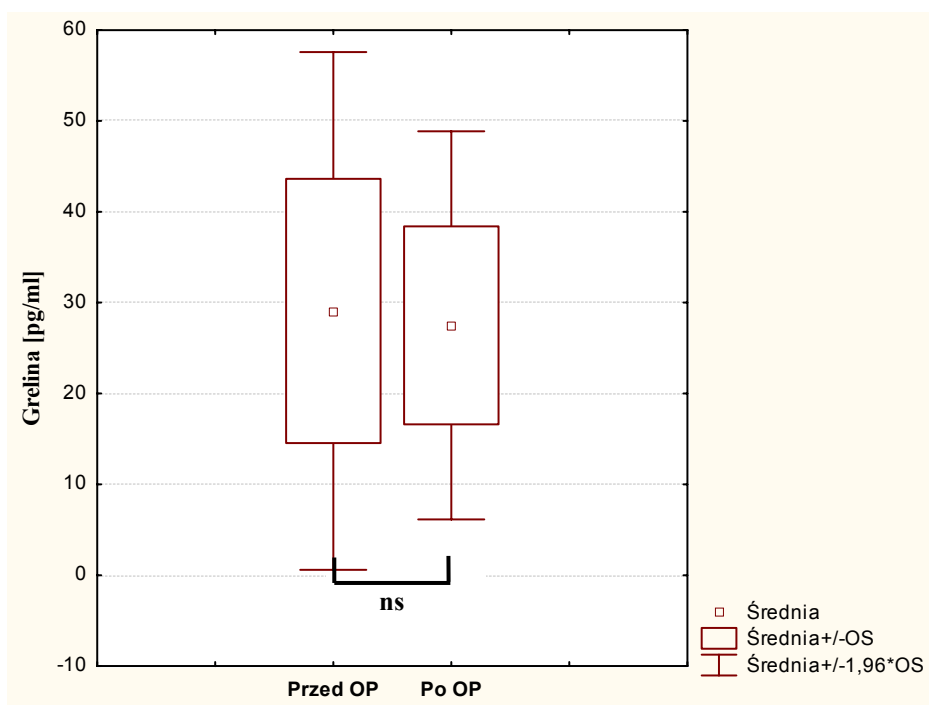
↑ - wzrost stężenia greliny; ↓ - spadek stężenia greliny; ↔ - brak zmian stężenia greliny

Z kolei porównując stężenie greliny na czczo przed oraz 7 dni po zabiegu operacyjnym stwierdzono brak statystycznie istotnej różnicy w stężeniu greliny w grupie mężczyzn ($p=0,2$). Z kolei w grupie kobiet nastąpił statystycznie istotny wzrost stężenia greliny na czczo po zabiegu operacyjnym ($p=0,01$) - tabela 14 oraz rysunek 24 i 25.

Tabela 14. Średnie stężenie greliny na czczo \pm OS [pg/ml] przed oraz 7 dni po zabiegu operacyjnym.

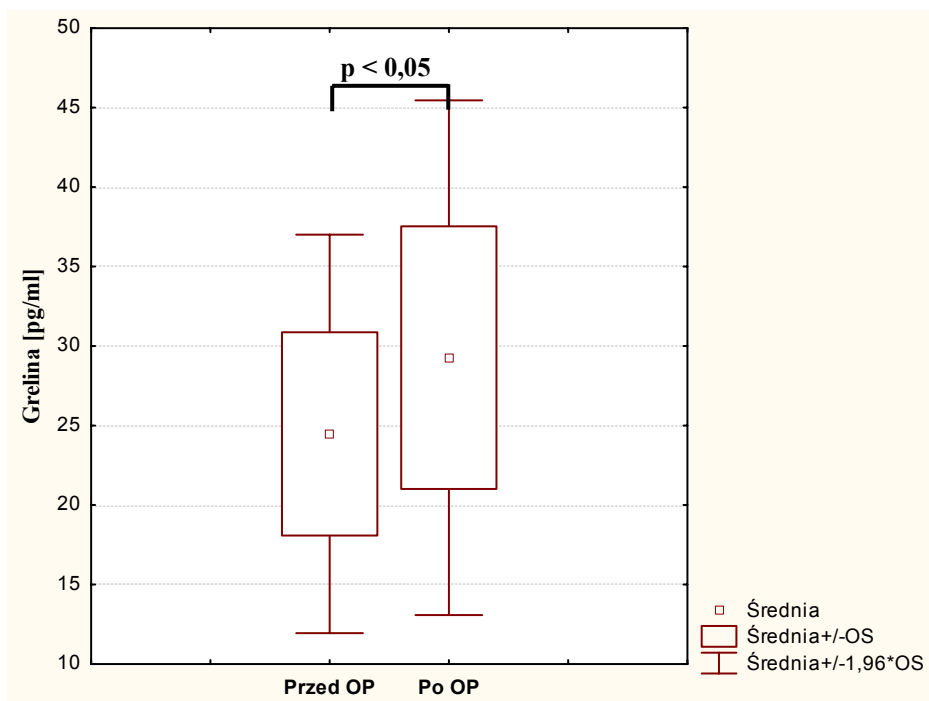
	Grelina przed operacją	Grelina po Operacji	P value
Kobiety \pm OS	24,5 \pm 6,4	29,2 \pm 8,3	0,01*
Mężczyźni \pm OS	29,1 \pm 14,5	27,5 \pm 10,9	0,2

Mężczyźni



Rysunek 24. Wykres przedstawiający średnie stężenie greliny \pm OS na czczo przed oraz 7 dni po zabiegu operacyjnym w grupie mężczyzn z RJG.

Kobiety



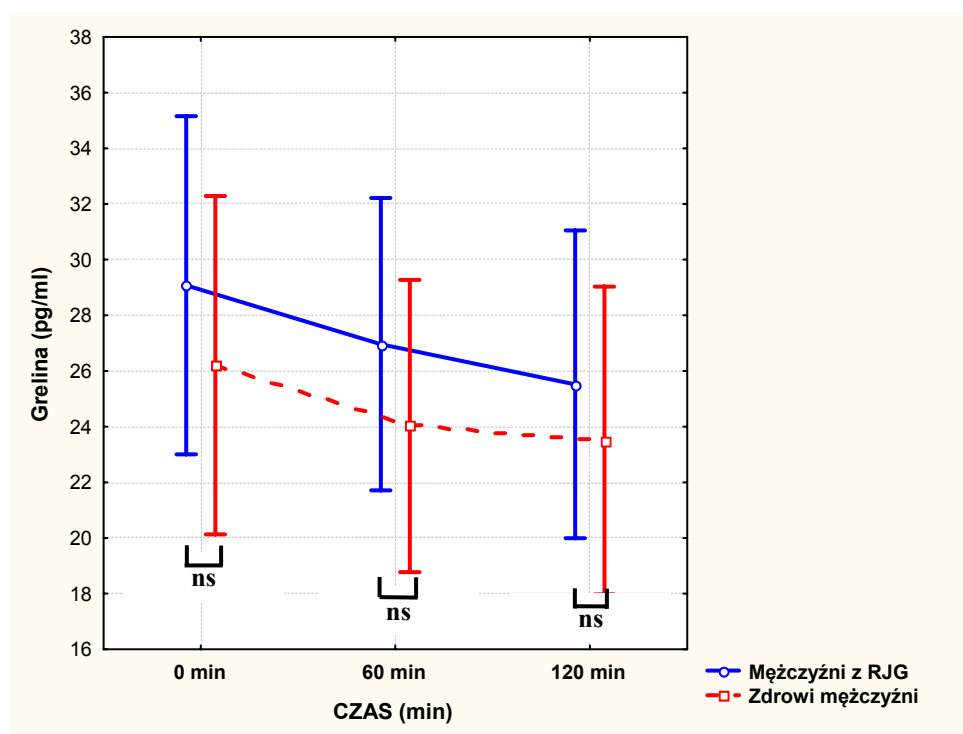
Rysunek 25. Wykres przedstawiający średnie stężenie greliny na czczo przed oraz 7 dni po zabiegu operacyjnym w grupie kobiet z RJG.

PORÓWNANIE GRUPY KONTROLNEJ oraz GRUPY Z RJG:

Tabela 15 oraz rysunek 26 przedstawiają porównanie średniego stężenia greliny na czczo oraz 60 i 120 min po doustnym podaniu 100ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie zdrowych mężczyzn oraz z rakiem jelita grubego. Średnie stężenie greliny w grupie zdrowych mężczyzn było niższe w porównaniu do grupy pacjentów z RJG. Różnice w stężeniu greliny pomiędzy tymi grupami w danym punkcie czasu są jednak statystycznie nieistotne.

Tabela 15. Średnie stężenie greliny na czczo oraz po doustnym podaniu mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych \pm odchylenie standardowe [pg/ml] w grupie zdrowych mężczyzn oraz z RJG.

	0 min	60 min	120 min	P value
Mężczyźni z RJG	29,1 \pm 14,5	27,0 \pm 12,0	25,5 \pm 12,5	0,009
Zdrowi mężczyźni	26,2 \pm 8,5	24,0 \pm 8,2	23,5 \pm 8,9	0,0005
P value	0,5	0,4	0,6	



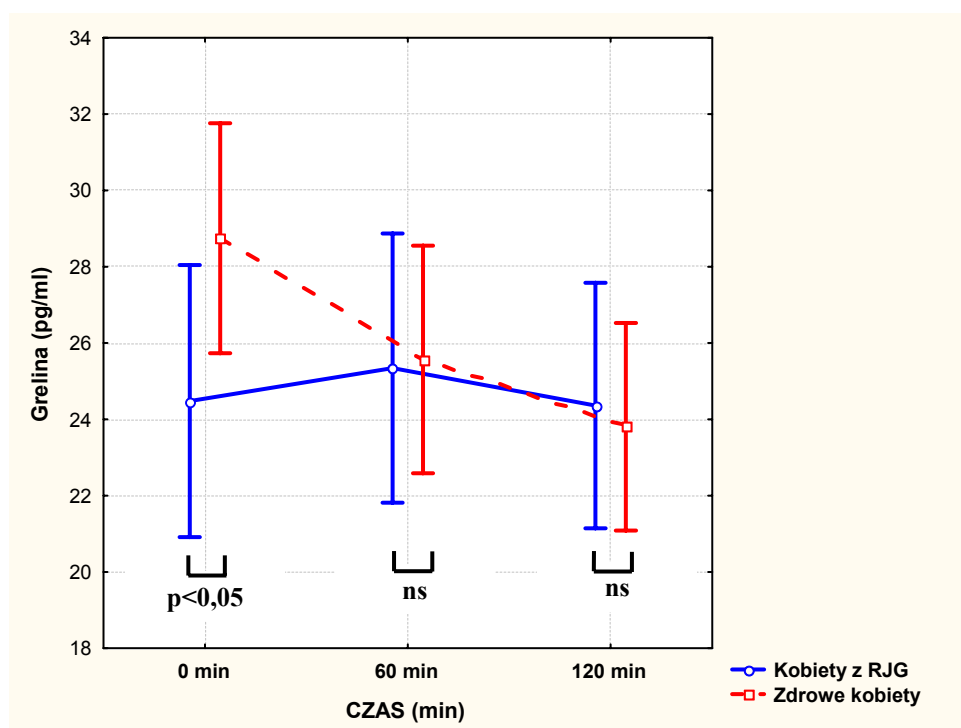
Rysunek 26. Wykres przedstawiający zmiany średniego stężenia greliny (oraz 95% przedział ufności) na czczo oraz 60 i 120 min po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie zdrowych mężczyzn oraz z rakiem jelita grubego.

Z kolei tabela 16 oraz rysunek 27 przedstawiają porównanie zmian średniego stężenia greliny na czczo oraz 60 i 120 min po doustnym podaniu 100ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie zdrowych kobiet oraz z rakiem jelita grubego. Stężenie greliny na czczo w grupie zdrowych kobiet jest statystycznie istotnie

wyższe w porównaniu do grupy pacjentek z RJG ($p=0,048$) oraz w grupie pacjentek z RJG nie wykazano spadku średniego stężenia greliny po posiłku w porównaniu do grupy zdrowych kobiet.

Tabela 16. Średnie stężenie greliny na czczo oraz po doustnym podaniu mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych \pm odchylenie standardowe [pg/ml] w grupie zdrowych kobiet oraz z RJG.

	0 min	60 min	120 min	P value
Kobiety z RJG	24,5 \pm 6,4	25,3 \pm 6,2	24,4 \pm 6,3	0,8
Zdrowe kobiety	28,7 \pm 7,1	25,6 \pm 7,1	23,8 \pm 6,0	< 0,001
P value	0,048	0,92	0,78	



Rysunek 27. Wykres zmian średniego stężenia greliny (oraz 95% przedział ufności) na czczo oraz 60 i 120 min po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie zdrowych kobiet oraz z rakiem jelita grubego.

ZMIANY ŚREDNIEGO STEŻENIA GREliny U CHORYRCH Z RAKIEM JELITA GRUBEGO W ZALEŻNOŚCI OD BMI

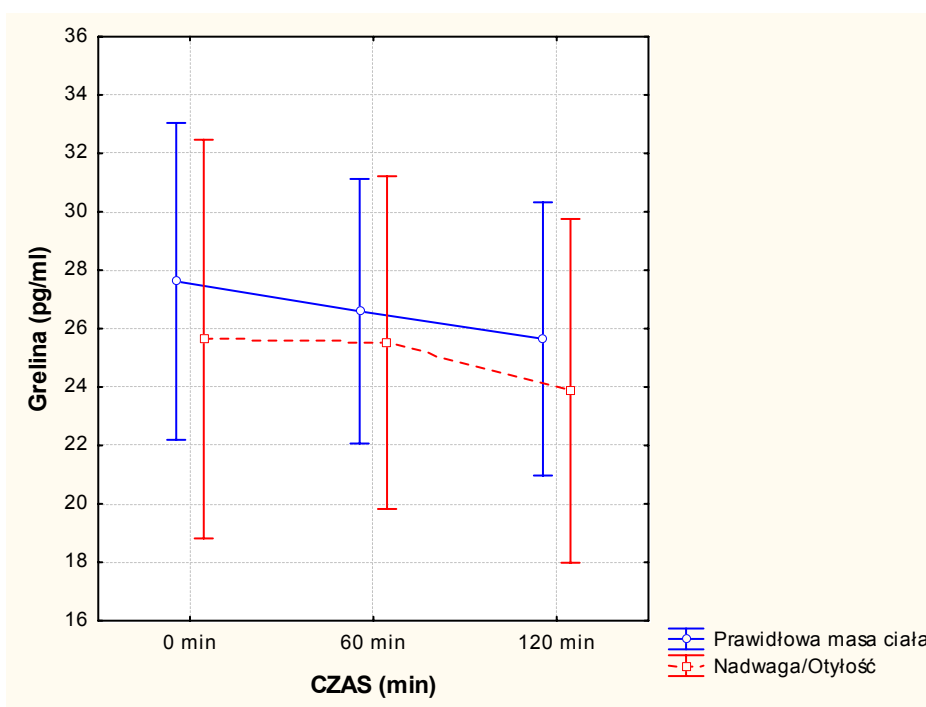
Tabela 17 oraz rysunek 28 przedstawiają porównanie stężenia greliny na czczo oraz 60 i 120 min po doustnym podaniu 100ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie pacjentów z rakiem jelita grubego podzielonych ze względu na wartość wskaźnika masy ciała. Zgodnie z wytycznymi WHO pacjenci, których wskaźnik masy ciała mieścił się pomiędzy 18,5-24,9 kg/m² byli kwalifikowani do grupy pacjentów z

prawidłową masą ciała. Z kolei osoby, których wskaźnik masy ciała wyniósł $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ byli kwalifikowani do grupy pacjentów z nadwagą/otyłością.

Średnie stężenie greliny zarówno na czczo jak i po 60 i 120 min od podania mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych jest niższe w grupie pacjentów z nadwagą/otyłością w porównaniu do grupy pacjentów z prawidłową masą ciała. Różnice w stężeniu greliny pomiędzy tymi grupami w danym punkcie czasu były jednak statystycznie nieistotne.

Tabela 17. Średnie stężenie greliny na czczo oraz 60 i 120 min po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych \pm odchylenie standardowe [pg/ml] w grupie pacjentów z prawidłową masą ciała (BMI 18,5-24,9 kg/m^2) oraz w grupie z nadwagą/otyłością (BMI $>25 \text{ kg/m}^2$).

	0 min	60 min	120 min	P value
Prawidłowa masa ciała	27,6 \pm 13,5	26,6 \pm 11,3	25,6 \pm 11,9	0,058
Nadwaga/Otyłość	25,6 \pm 7,47	25,5 \pm 5,9	23,9 \pm 5,4	0,2



Rysunek 28. Wykres zmian średniego stężenia greliny (oraz 95% przedział ufności) na czczo oraz 60 i 120 min po doustnym podaniu 100 ml długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie pacjentów prawidłową masą ciała (BMI 18,5-24,9 kg/m^2) oraz w grupie z nadwagą/otyłością (BMI $>25 \text{ kg/m}^2$).

Z kolei tabela 18 oraz rysunek 29 przedstawiają porównanie stężenia greliny na czczo oraz 60 i 120 min po spożyciu mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie pacjentów z rakiem jelita grubego podzielonych ze względu na wartość wskaźnika masy ciała oraz płęć. Wykorzystując test ANOVA z powtarzanymi pomiarami oraz testy post hoc w grupie mężczyzn z RJG o prawidłowej masie ciała obserwowano statystycznie istotny

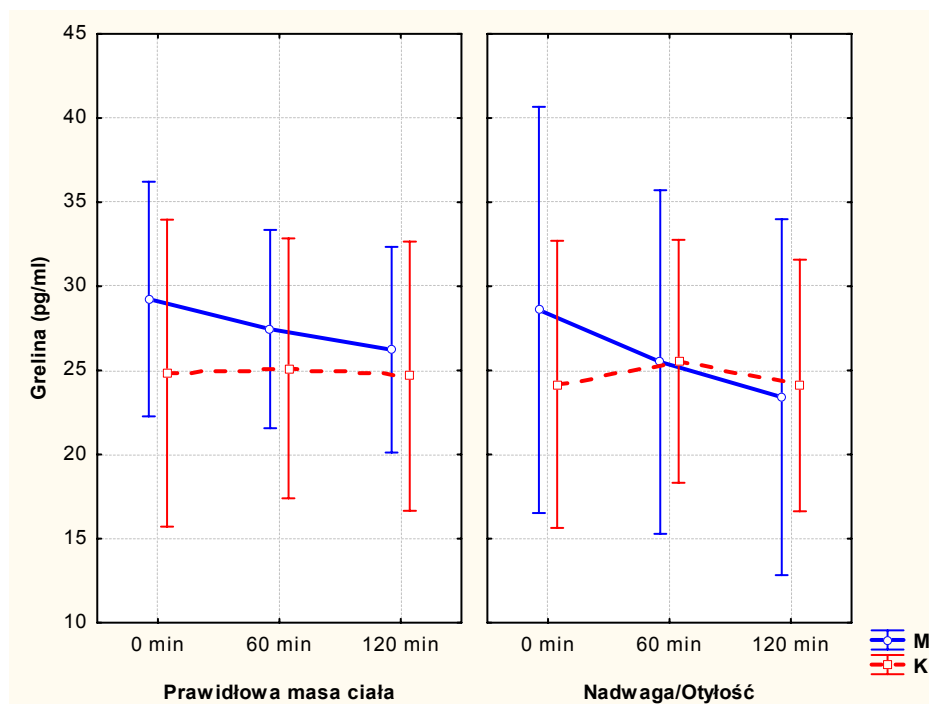
spadek poziomu greliny po 120 min po doustnym podaniu 100ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych ($p=0,04$). Z kolei w grupie mężczyzn z nadwagą/otyłością nie obserwuje się statystycznie istotnego spadku po tym czasie ($p=0,27$). Brak osiągnięcia statystycznie istotnego spadku był jednak spowodowany małą ilością osób w tej grupie (4 osoby).

W grupie kobiet z rakiem jelita grubego z prawidłową masą ciała nie obserwowano statystycznie istotnego spadku stężenia greliny w surowicy po 60 i 120 min po doustnym podaniu 100ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych ($p=0,85$). Z kolei w grupie kobiet z nadwagą/otyłością nie obserwowano po 60 min statystycznie istotnej zmiany (następował średni wzrost stężenia greliny w surowicy). Natomiast obserwowano statystycznie istotny spadek stężenia greliny w surowicy po 120 min w stosunku do poziomu po 60 min po doustnym podaniu 100ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych ($p=0,02$).

Tabela 18. Średnie stężenie greliny na czczo oraz 60 i 120 min po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych \pm odchylenie standardowe [pg/ml] w grupie pacjentów z prawidłową masą ciała (BMI 18,5-24,9 kg/m²) oraz w grupie z nadwagą/otyłością (BMI >25 kg/m²).

	0 min	60 min	120 min	P value
Prawidłowa masa ciała				
• Kobiety	24,8 \pm 7,6	25,1 \pm 6,7	24,7 \pm 6,8	0,85
• Mężczyźni	29,2 \pm 16	27,5 \pm 13,5	26,2 \pm 14,4	0,04
Nadwaga/Otyłość				
• Kobiety	24,1 \pm 5,7	25,5 \pm 6,1	21,1 \pm 6,3	0,02
• Mężczyźni	28,6 \pm 10,5	25,5 \pm 6,5	23,4 \pm 3,6	0,27

*Kolorem czerwonym zaznaczono statystycznie istotne wyniki



Rysunek 29. Wykres zmian średniego stężenia greliny (oraz 95% przedział ufności) na czczo oraz 60 i 120 min po podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie kobiet i mężczyzn z RJG z prawidłową masą ciała (BMI 18,5-24,9 kg/m²) oraz w grupie z nadwagą/otyłością (BMI >25 kg/m²).

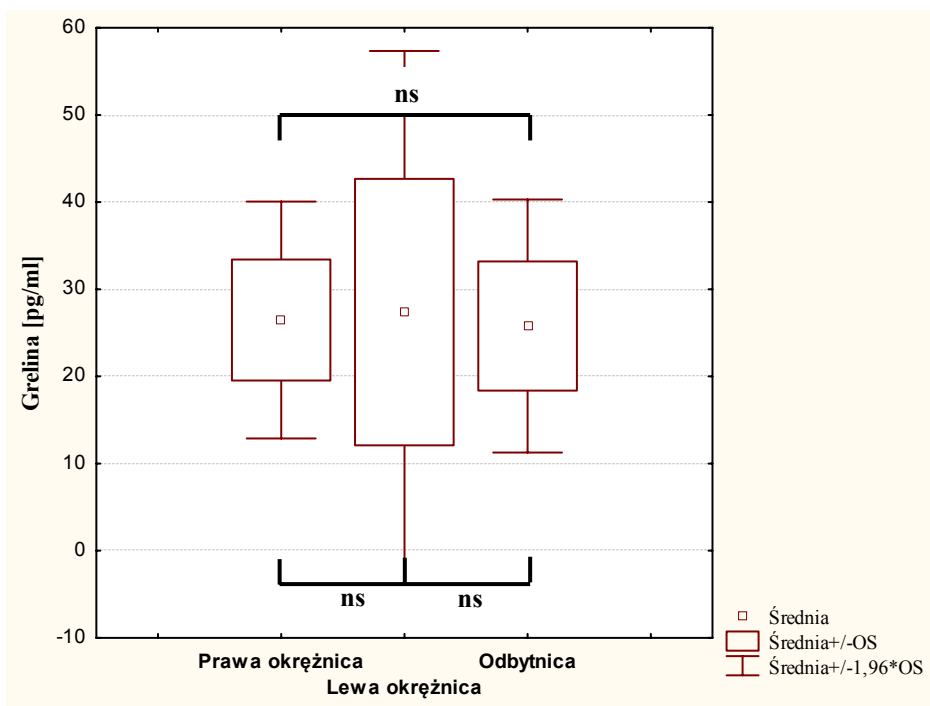
POZIOM GRELINY W ZALEŻNOŚCI OD LOKALIZACJI GUZA

Każdego pacjenta kwalifikowano do jednej z trzech grup w zależności od lokalizacji guza – guz zlokalizowany po stronie prawej, po stronie lewej oraz w odbytnicy. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w stężeniu greliny w zależności od lokalizacji guza ($p=0,5$). Tabela 19 oraz rysunek 30 przedstawiają średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe u pacjentów z guzem w danej lokalizacji.

Tabela 19. Średnie stężenie greliny na czczo \pm odchylenie standardowe u pacjentów z guzem w danej lokalizacji.

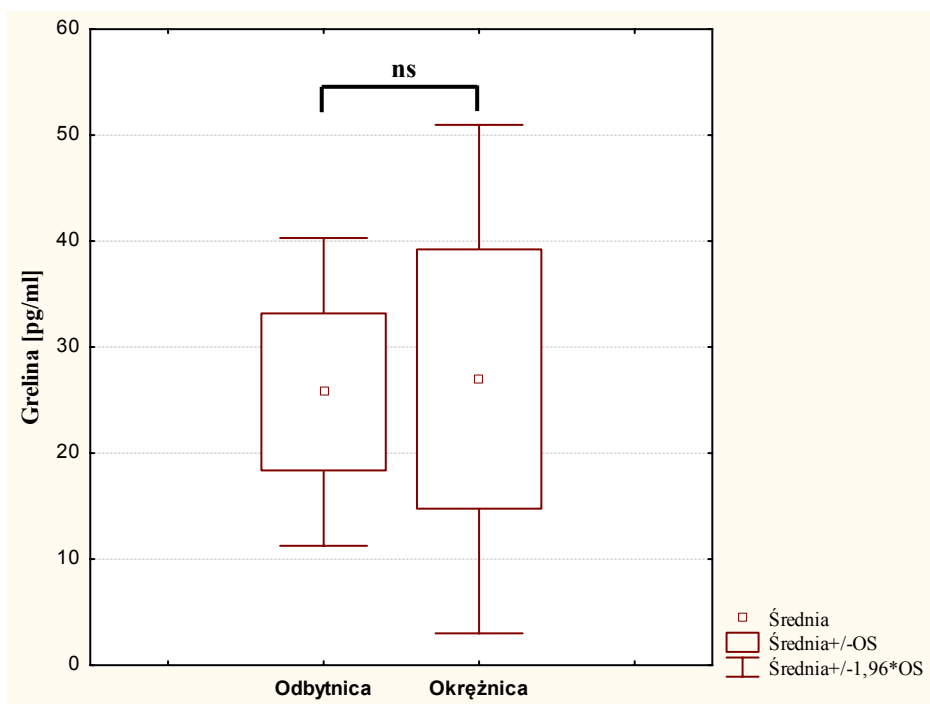
	Liczba pacjentów	Grelina (pg/ml) \pm OS
Wszyscy	47	26,85 \pm 11,4
Prawa strona	12	26,5 \pm 6,9
Lewa strona	16	27,4 \pm 15,3
Odbytnica	19	25,8 \pm 7,4

OS – odchylenie standardowe



Rysunek 30. Średnie stężenie greliny na czczo \pm odchylenie standardowe u pacjentów z guzem w danej lokalizacji.

Nie zaobserwowano również istotnej statystycznie różnicy w stężeniu greliny na czczo wyodrębniając jedynie 2 grupy związane z lokalizacją guza: lokalizacja w okrężnicy lub odbytnicy ($p=0,68$) – rysunek 31.

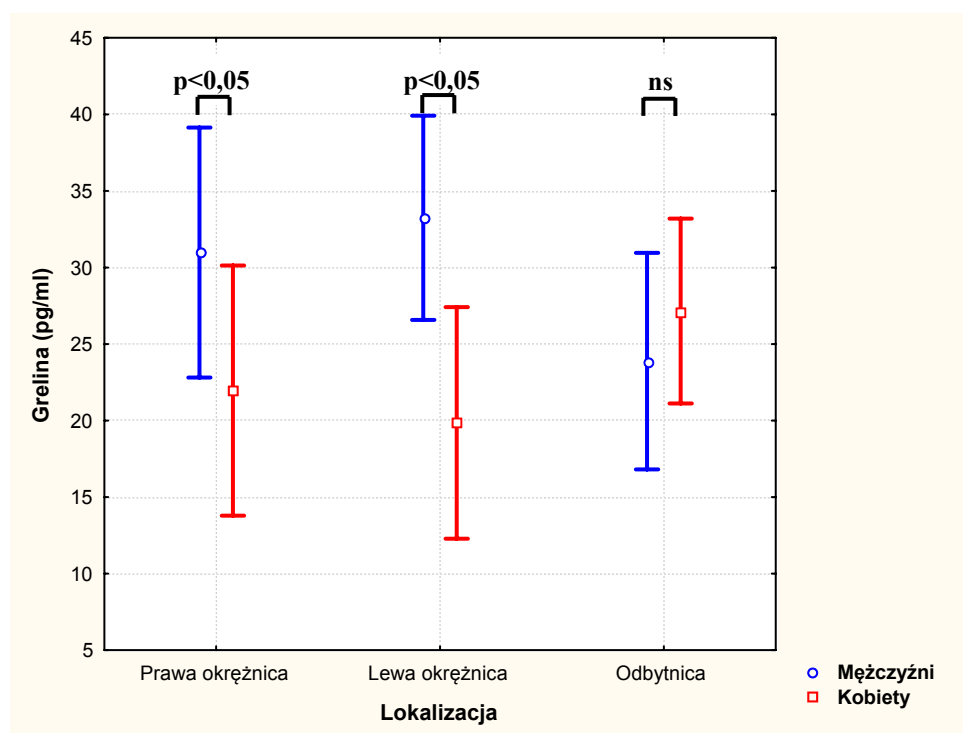


Rysunek 31. Średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe u pacjentów z guzem w danej lokalizacji.

Tabela 20 oraz rysunek 32 przedstawiają różnice w średnim stężeniu greliny w grupie kobiet i mężczyzn w zależności od lokalizacji guza. Wykazano statystycznie znamienne mniejsze stężenie greliny w grupie kobiet w stosunku do mężczyzn z rakiem jelita grubego zlokalizowanym w okrężnicy. Z kolei mężczyźni z RJG zlokalizowanym w odbytnicy mają niższe stężenie greliny w stosunku do grupy kobiet. Różnica ta jest jednak statystycznie nieistotna ($p=0,48$).

Tabela 20. Średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z daną lokalizacją guza.

	Prawa okrężnica	Lewa okrężnica	Odbytnica
Mężczyźni	31,0 \pm 5,5	33,2 \pm 17,7	23,9 \pm 9,0
Kobiety	22,0 \pm 5,2	19,8 \pm 7,1	27,2 \pm 6,0
P value	0,036	0,01	0,48



Rysunek 32. Wykres średniego stężenia greliny (oraz 95% przedział ufności) porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z daną lokalizacją guza.

POZIOM GRELINY W ZALEŻNOŚCI OD ZAAWANSOWANIA MIEJSCOWEGO (pT):

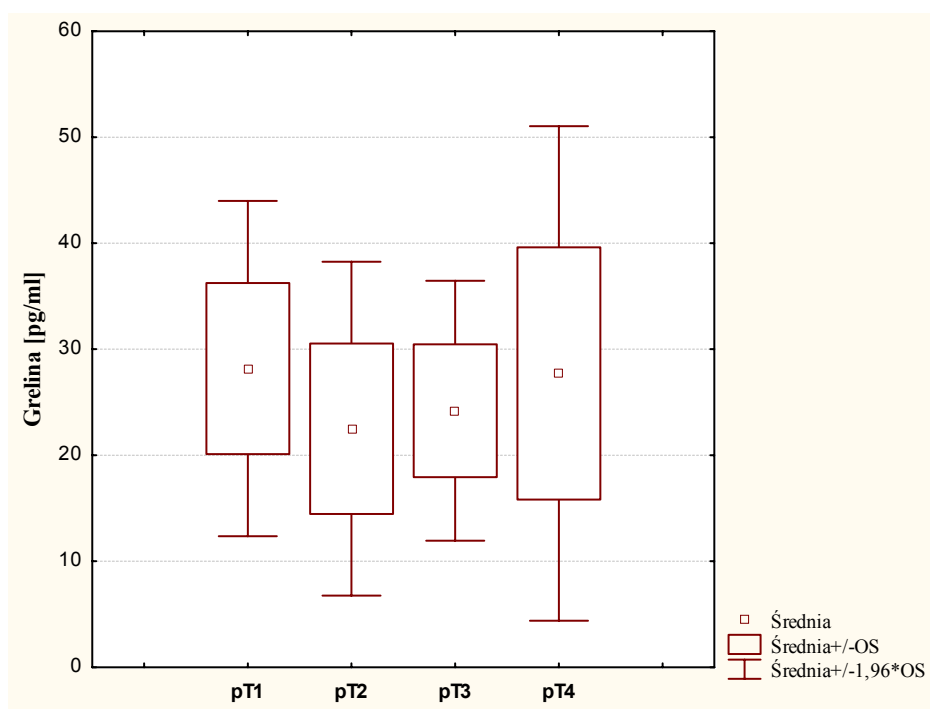
W zależności od stopnia zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego pT guza, ustalonego na podstawie pooperacyjnego badania histopatologicznego, pacjenta kwalifikowano do jednej z czterech grup: pT1, pT2, pT3, pT4. Nie zaobserwowano

statystycznie istotnych różnic w stężeniu greliny w zależności od stopnia zaawansowania pT ($p=0,53$). Tabela 21 oraz rysunek 33 przedstawiają średnie stężenie greliny na czczo \pm odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego pT.

Tabela 21. Średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego pT.

	Liczba pacjentów	Grelina (pg/ml) \pm OS
Wszyscy	47	26,85 \pm 11,4
pT1	5	28,2 \pm 8,1
pT2	8	22,5 \pm 8,0
pT3	5	24,2 \pm 6,3
pT4	29	27,7 \pm 11,9

OS – odchylenie standardowe

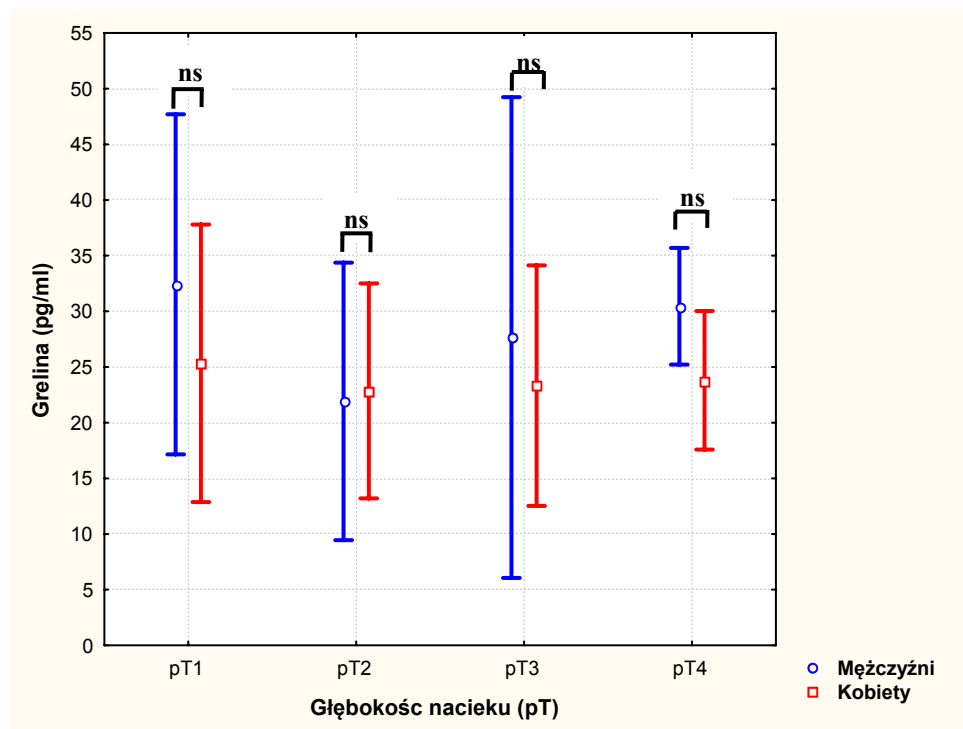


Rysunek 33. Średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego pT.

Tabela 22 oraz rysunek 34 przedstawiają różnice w stężeniu greliny w grupie kobiet i mężczyzn w zależności od stopnia zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego pT. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w stężeniach greliny w zależności od głębokości nacieku w grupie kobiet i mężczyzn z RJG.

Tabela 22. Średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe poró kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego (pT).

	pT1	pT2	pT3	pT4
Mężczyźni	32,4 \pm 10,6	21,9 \pm 9,43	27,6	30,5 \pm 13,9
Kobiety	25,3 \pm 6,6	22,9 \pm 8,3	23,3 \pm 6,9	23,8 \pm 6,9



Rysunek 34. Wykres przedstawiający średnie stężenie greliny oraz 95% przedział ufności porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego (pT).

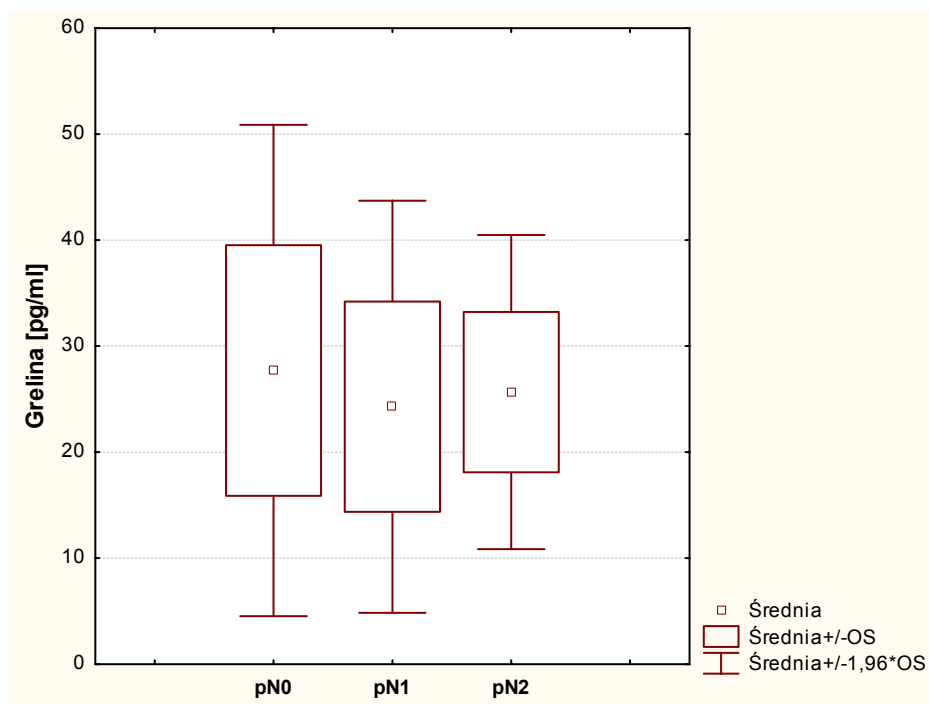
POZIOM GRELINY W ZALEŻNOŚCI OD STOPNIA ZAJĘCIA WĘZŁÓW CHŁONNYCH (pN):

W zależności od stopnia zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego (pN) pacjenta włączano do jednej z trzech grup – brak przerzutów raka w regionalnych węzłach chłonnych (pN0), zajęcie 1-3 węzłów chłonnych (pN1) oraz zajęcie więcej niż trzech węzłów chłonnych (pN2). Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w stężeniu greliny w zależności od stopnia zajęcia węzłów chłonnych ($p=0,95$). Tabela 23 oraz rysunek 35 przedstawiają średnie stężenie greliny na czczo \pm odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego pN.

Tabela 23. Średnie stężenie greliny na czczo \pm odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego pN.

	Liczba pacjentów	Grelina (pg/ml) \pm OS
Wszyscy	47	26,85 \pm 11,4
pN0	26	27,7 \pm 11,8
pN1	10	24,3 \pm 9,9
pN2	11	25,7 \pm 7,6

OS – odchylenie standardowe

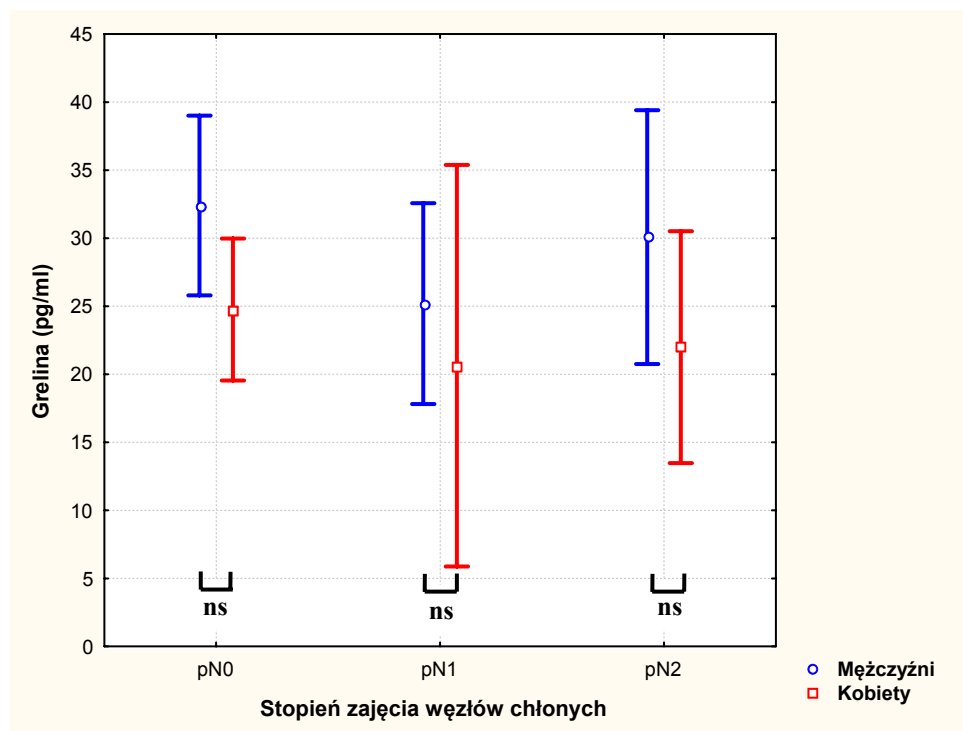


Rysunek 35. Średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zajęcia węzłów chłonnych.

Tabela 24 oraz rysunek 36 przedstawiają różnice w stężeniu greliny w grupie kobiet i mężczyzn w zależności od stopnia zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego pN. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w stężeniu greliny pomiędzy tymi grupami. ($p=0,36$).

Tabela 24. Średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zajęcia regionalnych węzłów chłonnych (pN).

	pN0	pN1	pN2
Mężczyźni	32,4 \pm 16,4	25,2 \pm 10,8	30,1 \pm 5,9
Kobiety	24,8 \pm 6,9	20,6 \pm 5,8	22,0 \pm 7,1



Rysunek 36. Wykres przedstawiający średnie stężenie greliny oraz 95% przedział ufności porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zajęcia regionalnych węzłów chłonnych (pN).

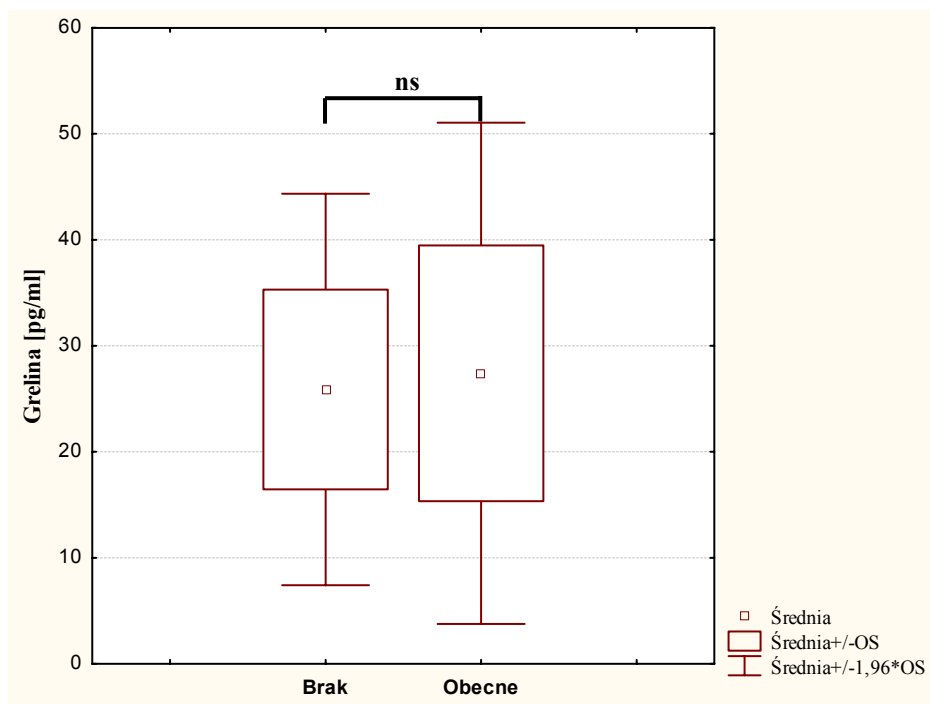
POZIOM GRELINY W ZALEŻNOŚCI OD BRAKU LUB OBECNOŚCI KOMÓREK RAKA ŚLUZOTWÓRCZEGO:

W zależności od obecności komórek raka śluzowotwórczego pacjentów kwalifikowano do jednej z dwóch grup – brak komórek raka śluzowotwórczego lub obecne komórki raka śluzowotwórczego. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w stężeniu greliny na czczo w zależności od obecności lub braku komórek raka śluzowotwórczego ($p=0,6$). Tabela 25 oraz rysunek 37 przedstawiają średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe u pacjentów bez oraz z rakiem śluzowotwórczym jelita grubego.

Tabela 25. Średnie stężenie greliny na czczo \pm odchylenie standardowe u pacjentów z rakiem śluzowotwórczym jelita grubego lub bez.

	Liczba pacjentów	Grelina (pg/ml) \pm OS
Wszyscy	47	26,85 \pm 11,4
Rak śluzowotwórczy	19	27,4 \pm 12,1
Brak komórek raka śluzowotwórczego	28	25,8 \pm 9,4

OS – odchylenie standardowe

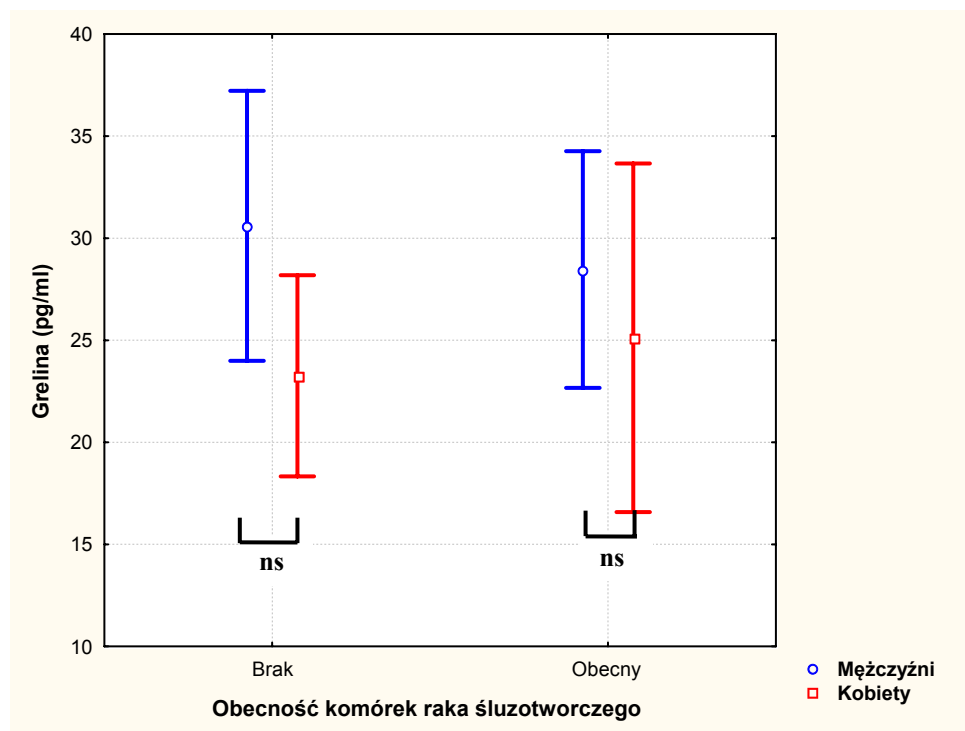


Rysunek 37. Średnie stężenie greliny na czczo ± odchylenie standardowe u pacjentów z rakiem jelita grubego z lub bez komponenty śluzowotwórczej.

Tabela 26 oraz rysunek 38 przedstawiają różnice w stężeniu greliny na czczo w grupie kobiet i mężczyzn w zależności od braku lub obecności komórek raka śluzowotwórczego. Nie obserwuje się istotnej statystycznie różnicy stężenia greliny pomiędzy grupą kobiet z brakiem lub obecnością komórek raka śluzowotwórczego. Podobnie wygląda sytuacja w grupie mężczyzn ($p=0,45$).

Tabela 26. Średnie stężenie greliny ± odchylenie standardowe porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z obecnością lub brakiem komórek raka śluzowotwórczego.

	Brak	Obecny
Mężczyźni	30,7 ± 11,2	28,5 ± 14,3
Kobiety	23,3 ± 7,4	25,0 ± 4,7



Rysunek 38. Wykres przedstawiający średnie stężenie greliny oraz 95% przedział ufności porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z obecnością lub brakiem komórek raka śluzotwórczego.

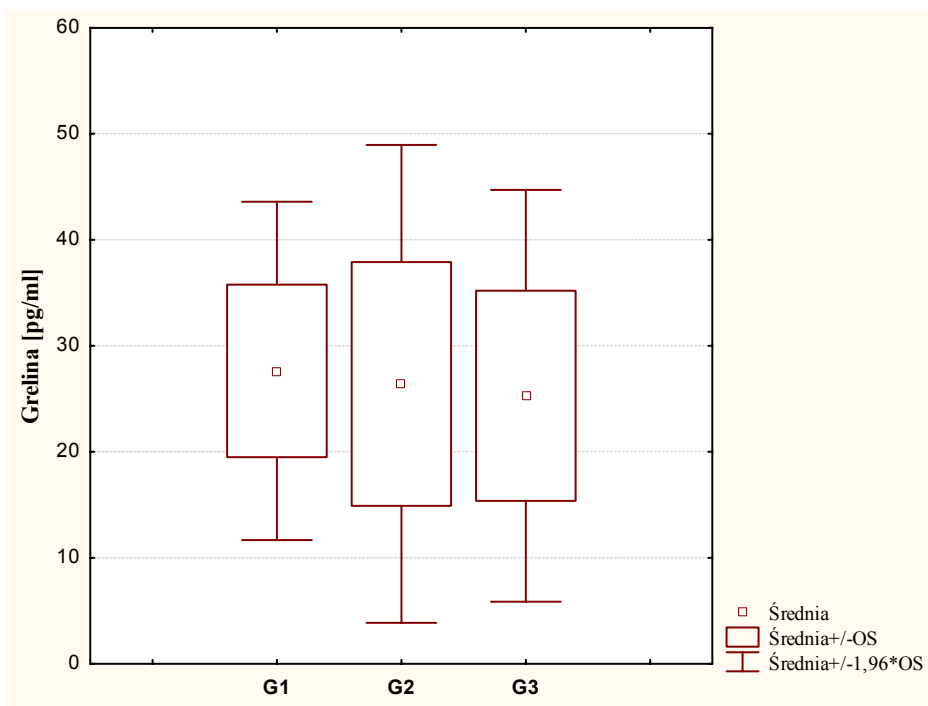
POZIOM GRELINY W ZALEŻNOŚCI OD STOPNIA ZRÓŻNICOWANIA KOMÓREK RAKA JELITA GRUBEGO (G):

W zależności od stopnia zróżnicowania komórek RJG pacjentów kwalifikowano do jednej z trzech grup – komórki wysokozróżnicowane (G1), średniozróżnicowane (G2) oraz niskozróżnicowane (G3). Tabela 27 oraz rysunek 39 przedstawiają średnie stężenie greliny na czczo \pm odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zróżnicowania komórek RJG. Można zauważyć zmniejszanie się średniego stężenia greliny wraz z zmniejszaniem stopnia zróżnicowania komórek RJG. Nie zaobserwowano jednak statystycznie istotnych różnic w stężeniu greliny w zależności stopnia zróżnicowania komórek RJG ($p=0,36$).

Tabela 27. Średnie stężenie greliny na czczo \pm odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zróżnicowania komórek RJG.

	Liczba pacjentów	Grelina (pg/ml) \pm OS
Wszyscy	47	26,85 \pm 11,4
G1	10	27,63 \pm 8,1
G2	30	26,4 \pm 11,5
G3	7	25,3 \pm 9,9

OS – odchylenie standardowe

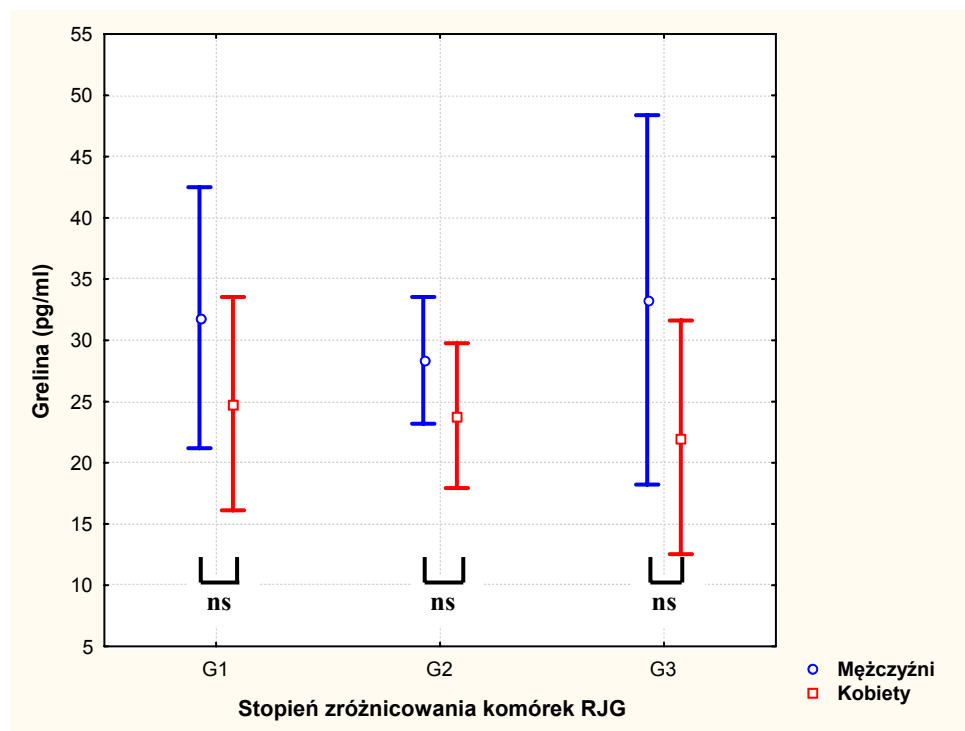


Rysunek 39. Średnie stężenie greliny na czczo \pm odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zróżnicowania komórek RJG.

Analizując stężenie greliny na czczo w zależności od stopnia zróżnicowania komórek RJG w grupie kobiet i mężczyzn można zauważyć, że jedynie w grupie kobiet z RJG obserwuje się spadek stężenia greliny wraz z zmniejszeniem zróżnicowania komórek. W grupie mężczyzn spadek ten zaburzony jest przez wzrost stężenia greliny w stopniu G3. Różnice te nie są jednak statystycznie istotne ($p=0,8$) – tabela 28 oraz rysunek 40.

Tabela 28. Średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zróżnicowania komórek RJG (G).

	G1	G2	G3
Mężczyźni	31,8 \pm 10,4	28,4 \pm 14,0	33,0 \pm 7,8
Kobiety	24,8 \pm 5,6	23,8 \pm 6,6	22,1 \pm 9,3



Rysunek 40. Wykres przedstawiający średnie stężenie greliny oraz 95% przedział ufności porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zróżnicowania komórek RJG (G).

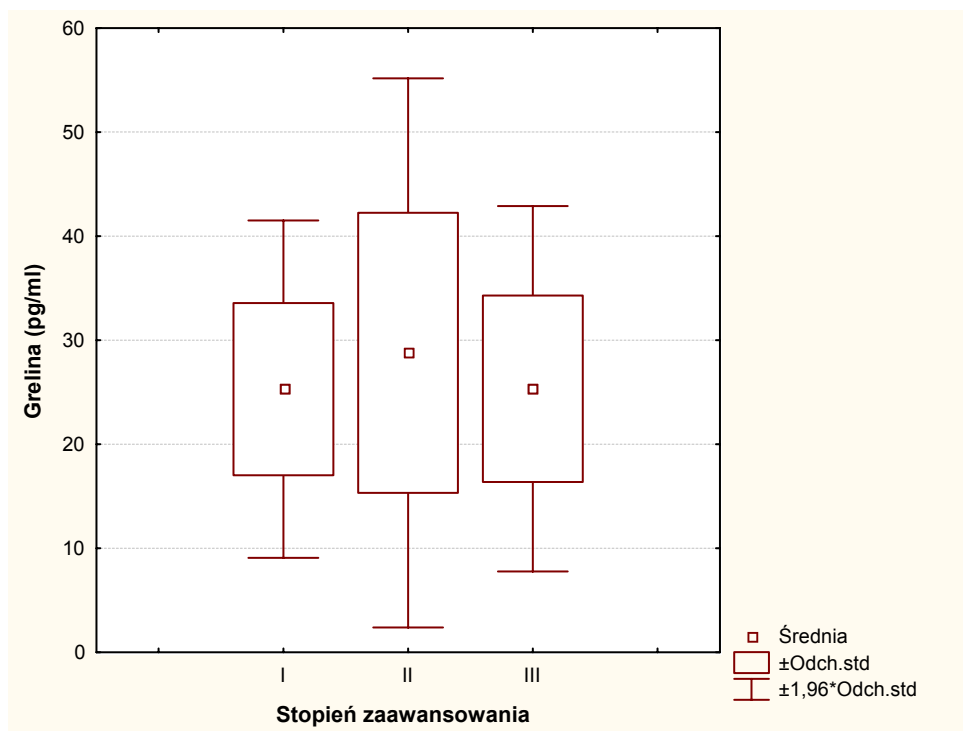
POZIOM GRELINY W ZALEŻNOŚCI OD STOPNIA ZAAWANSOWANIA KLINICZNO-MORFOLOGICZNEGO:

W zależności od stopnia zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego włączano pacjenta do jednej z trzech grup – stopień I, stopień II oraz stopień III. Tabela 29 oraz rysunek 41 przedstawiają średnie stężenie greliny na czczo \pm odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w stężeniu greliny w zależności od stopnia zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego ($p=0,98$).

Tabela 29. Średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego.

	Liczba pacjentów	Grelina (pg/ml) \pm OS
Wszyscy	47	26,85 \pm 11,4
Stopień I	12	25,3 \pm 8,3
Stopień II	16	28,8 \pm 13,5
Stopień III	19	25,3 \pm 9,0

OS – odchylenie standardowe

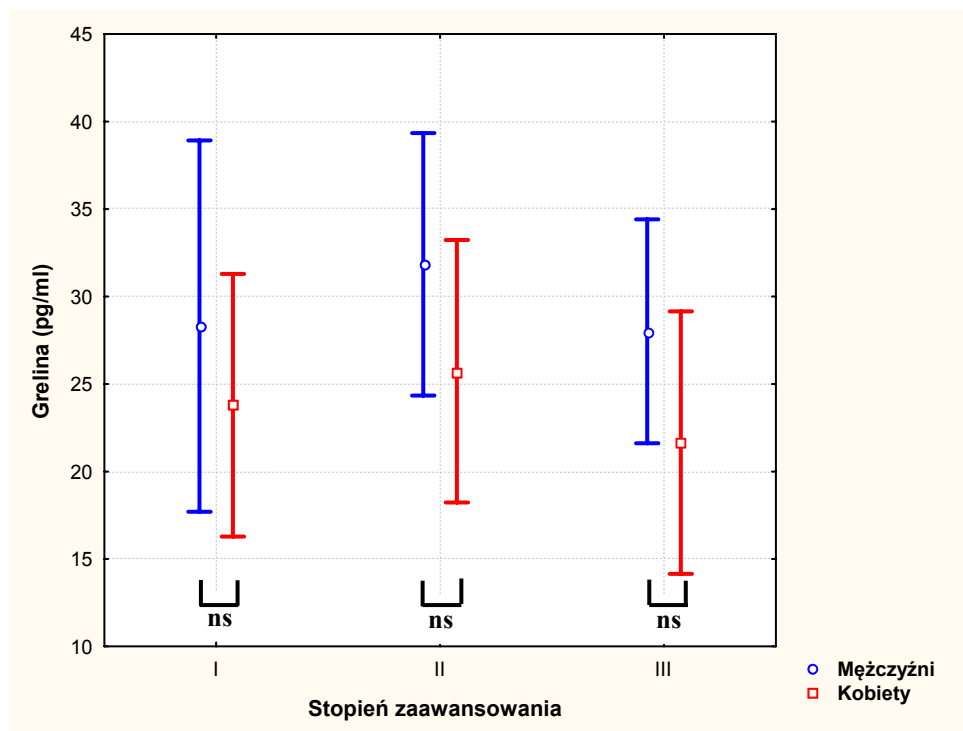


Rysunek 41. Średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego.

Tabela 30 oraz rysunek 42 przedstawiają różnice w stężeniu greliny w grupie kobiet i mężczyzn w zależności od stopnia zaawansowania. Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy stężenia greliny pomiędzy grupą kobiet i mężczyzn z danym stopniem zaawansowania RJG.

Tabela 30. Średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zaawansowania kliniczno-morfologicznego.

	I	II	III
Mężczyźni	28,3 \pm 10,4	31,8 \pm 18,0	28,0 \pm 9,8
Kobiety	23,8 \pm 7,3	25,7 \pm 6,8	21,6 \pm 6,4



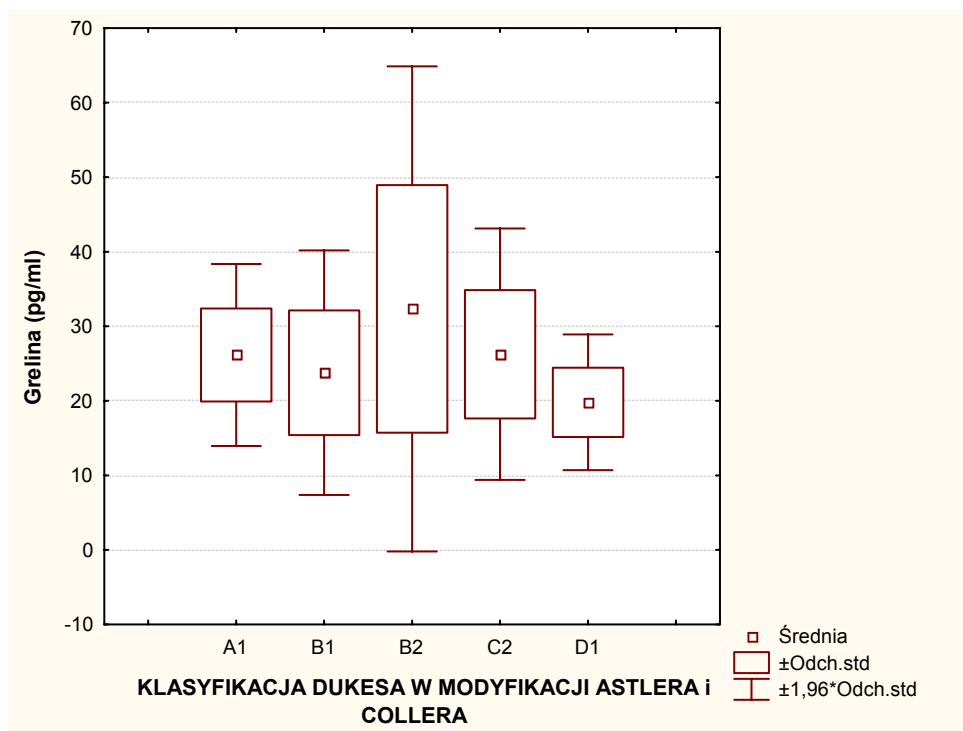
Rysunek 42. Wykres przedstawiający średnie stężenie greliny oraz 95% przedział ufności porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zaawansowania kliniczno-morfologicznego.

POZIOM GRELINY W ZALEŻNOŚCI OD STOPNIA ZAAWANSOWANIA RJG WG KLASYFIKACJI DUKESA W MODYFIKACJI ASTLERA I COLLERA:

W zależności od stopnia zaawansowania RJG pacjentów kwalifikowano do jednej z czterech grup – B1, B2, C2, D1. W badanej grupie nie było żadnego przypadku zaawansowania RJG A1 oraz C1. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w stężeniu greliny w zależności od stopnia zaawansowania RJG wg klasyfikacji Dukesa w modyfikacji Astlra i Collera ($p=0,96$). Tabela 31 oraz rysunek 43 przedstawiają średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania RJG wg klasyfikacji Dukesa w modyfikacji Astlra i Collera.

Tabela 31. Średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania RJG wg klasyfikacji Dukesa w modyfikacji Astlra i Collera.

	Liczba pacjentów	Grelina (pg/ml) \pm OS
Wszyscy	47	26,85 \pm 11,4
A	3	26,2 \pm 6,2
B1	12	23,8 \pm 8,4
B2	10	32,5 \pm 15,6
C2	20	25,9 \pm 8,6
D1	2	19,18 \pm 4,6

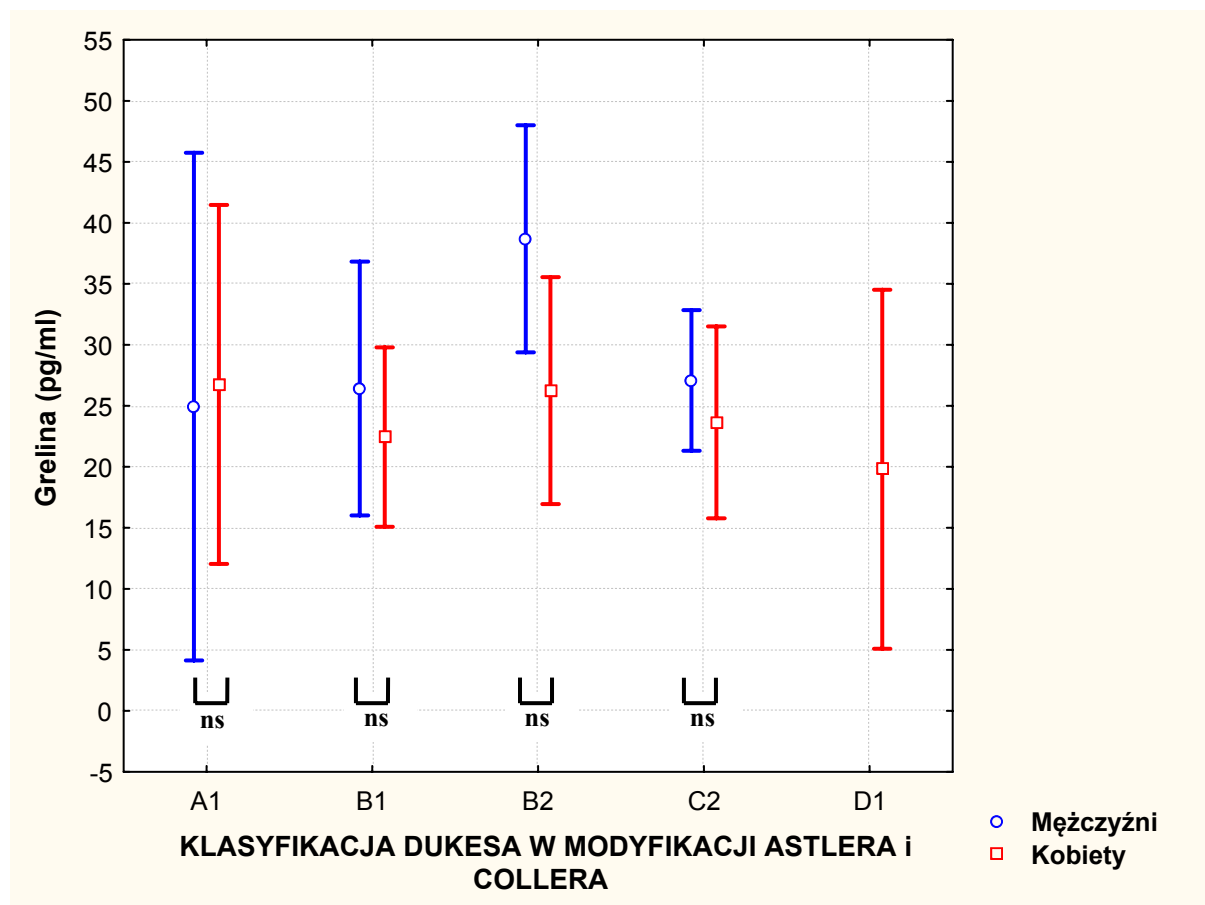


Rysunek 43. Średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania RJG wg klasyfikacji Dukesa w modyfikacji Astlra i Collera.

Tabela 32 oraz rysunek 44 przedstawiają różnice w stężeniu greliny w grupie kobiet i mężczyzn w zależności od stopnia zaawansowania wg skali Dukesa w modyfikacji Astlra-Collera. Nie obserwuje się istotnej statystycznie różnicy stężenia greliny pomiędzy grupą kobiet/mężczyzn z danym stopniem zaawansowania RJG.

Tabela 32. Średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zaawansowania wg klasyfikacji Dukesa w modyfikacji Astlra-Collera.

	A1	B1	B2	C2	D1
Mężczyźni	24,9	26,4 \pm 11,8	38,7 \pm 20,0	27,1 \pm 9,2	-
Kobiety	26,7 \pm 8,7	22,4 \pm 6,7	26,2 \pm 7,3	23,6 \pm 7,5	19,8 \pm 4,6



Rysunek 44. Wykres przedstawiający średnie stężenie greliny oraz 95% przedział ufności porównujący grupy kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zaawansowania wg klasyfikacji Dukeasa w modyfikacji Astlera-Collera.

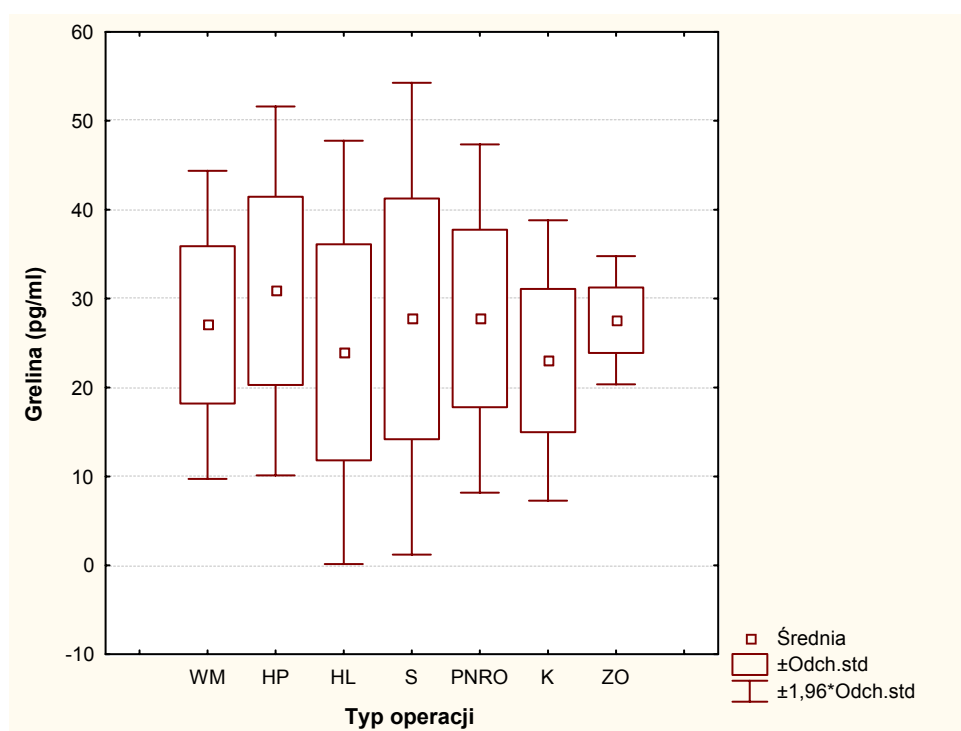
POOPERACYJNE STĘŻENIE GRELINY Z ZALEŻNOŚCI OD TYPU OPERACJI

W zależności od typu wykonanego zabiegu pacjentów kwalifikowano do jednej z siedmiu grup. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w stężeniu greliny w zależności od typu operacji ($p=0,33$). Tabel 33 oraz rysunek 45 przedstawiają średnie stężenie greliny \pm odchylenie standardowe u pacjentów poddanych danemu typowi operacji.

Tabela 33. Średnie stężenie greliny przed oraz w 7 dni po zabiegu operacyjnym \pm odchylenie standardowe u pacjentów poddanych danemu zabiegowi operacyjnemu.

Typ wykonanej operacji:	Liczba chorych	Grelina (pg/ml) \pm OS	
		Przed OP	Po OP
- Wycięcie miejscowe w technice TEM	3	31,1 \pm 9,8	27,04 \pm 8,8
- Hemikolektomia prawostronna	12	29,1 \pm 7,4	30,9 \pm 10,6
- Hemikolektomia lewostronna	6	24,0 \pm 13,1	24,0 \pm 12,1
- Sigmoidektomia	8	30,0 \pm 17,8	27,7 \pm 13,5
- Przednia niska resekcja odbytnicy	12	24,3 \pm 7,6	27,8 \pm 10,0
- Kolektomia	3	25,6 \pm 7,2	13,0 \pm 8,0
- Zespolenie omijające	2	19,8 \pm 4,6	27,6 \pm 3,7
- Międzyzwieraczowa resekcja odbytnicy	1	22,5*	20,34*

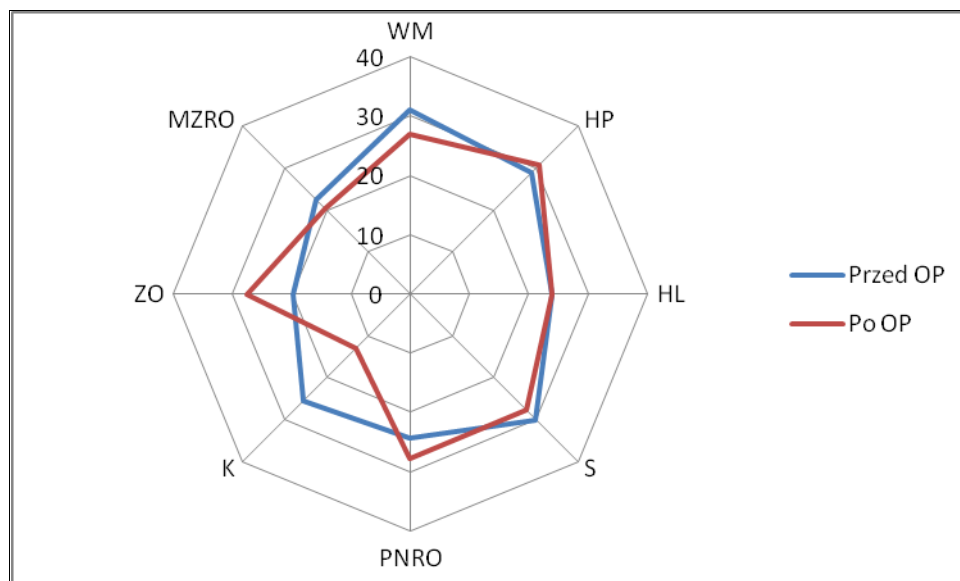
* W przypadku międzyzwieraczowej resekcji odbytnicy nie podano odchylenia standardowego ponieważ tego typu zabieg wykonano tylko jeden.



Rysunek 45. Średnie stężenie greliny w 7. dobie po zabiegu operacyjnym \pm odchylenie standardowe u pacjentów poddanych danemu zabiegowi operacyjnemu. WM – wycięcie miejscowe w technice TEM, HP – hemikolektomia prawostronna, HL – hemikolektomia lewostronna, S – sigmoidektomia, PNRO – przednia niska resekcja odbytnicy, K – kolektomia, ZO – zespolenie omijające.

*Na wykresie nie umieszczono stężenia greliny \pm OS pacjenta poddanego międzyzwieraczowej resekcji odbytnicy ponieważ tego typu zabieg wykonano tylko jeden.

Rysunek 46 przedstawia zmiany stężenia greliny przed i w 7. dobie po zabiegu operacyjnym w zależności od typu wykonanego zabiegu. Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w średnich stężeniach greliny przed i po operacji. Można zauważyć wzrost stężenie greliny po wykonaniu zespolenia omijającego. Zważywszy jednak na małą liczbę pacjentów (2) różnica ta nie jest istotna statystycznie.



Rysunek 46. Wykres radarowy średniego stężenia greliny na czczo przed oraz w 7 dni po zabiegu operacyjnym u pacjentów poddanych danemu zabiegowi operacyjnemu. WM – wycięcie miejscowe w technice TEM, HP – hemikolektomia prawostronna, HL – hemikolektomia lewostronna, S – sigmoidektomia, PNRO – przednia niska resekcja odbytnicy, K – kolektomia, ZO – zespolenie omijające, MZRO – międzyzwieraczowa resekcja odbytnicy.

KORELACJA STEŻENIA GRELINY Z INNYMI BADANYMI PARAMETRAMI

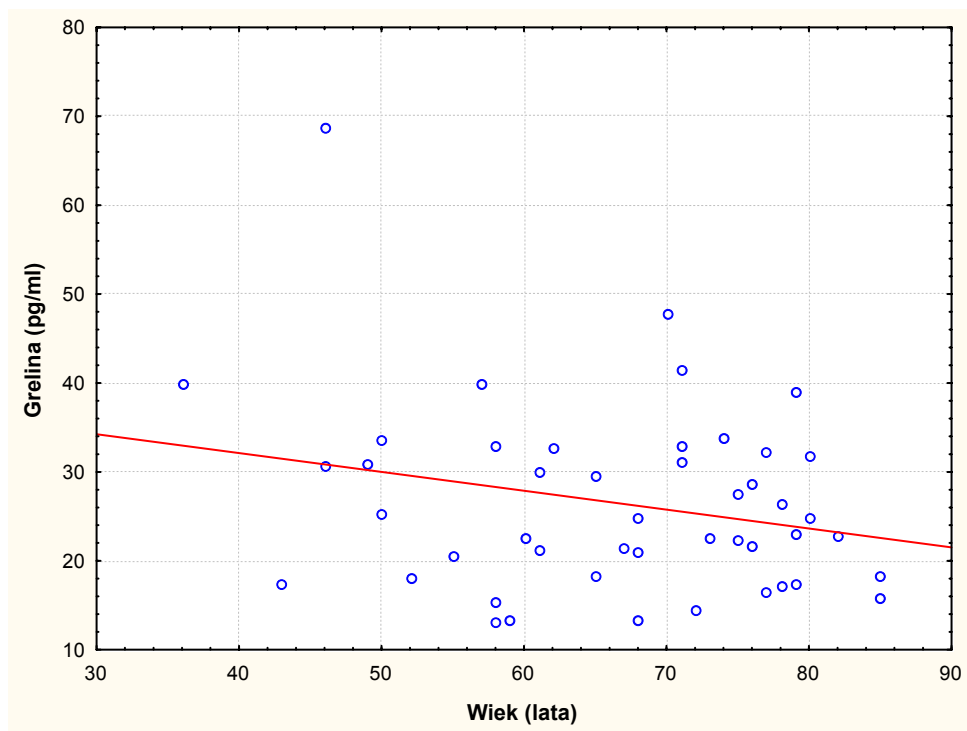
Przeprowadzono również analizę korelacji stężenia greliny na czczo z masą ciała, wzrostem, procentową zawartością tkanki tłuszczowej, całkowitą liczbą limfocytów, stężeniem białka, albumin, CEA oraz leptyny w surowicy krwi - tabela 34. Nie stwierdzono korelacji stężenia greliny z wiekiem, wagą, wzrostem, całkowitą liczbą limfocytów we krwi (TLC – total lymphocyte count), stężeniem albumin, białka i leptyny oraz stężeniem antygenu karcynoembrionalnego.

Tabela 34. Analiza korelacji stężenia greliny na czczo z innymi parametrami w grupie pacjentów z RJG.

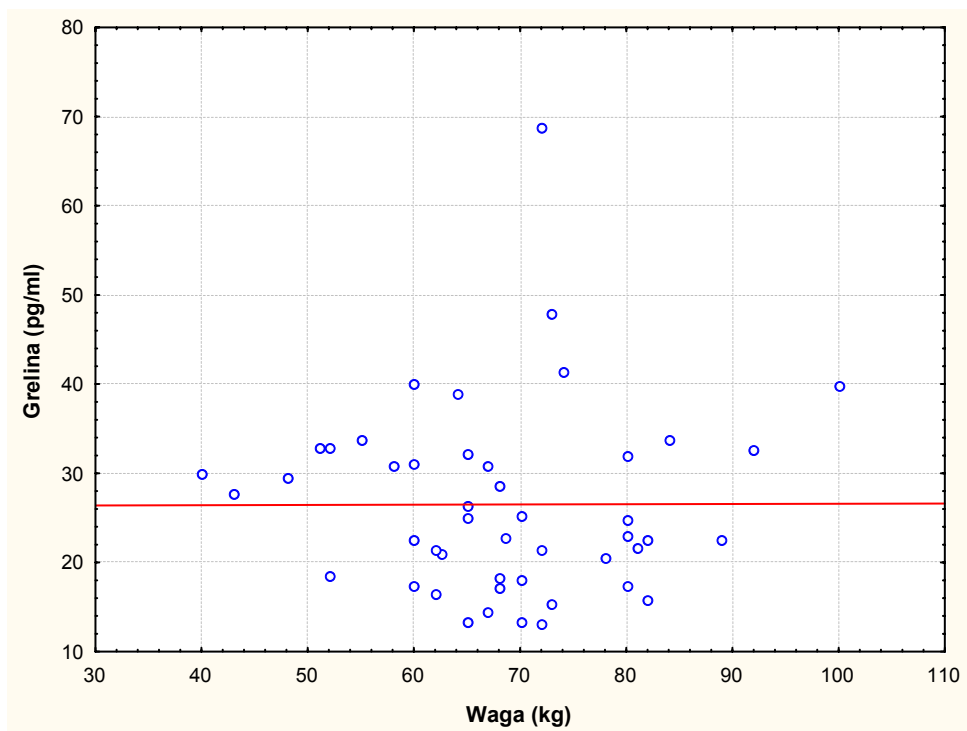
Parametr	R	R²	P
Wiek	-0,14	0,02	0,34
Waga	-0,08	0,006	0,6
Wzrost	0,14	0,02	0,34
TLC	0,22	0,05	0,13
% zawartość tkanki tłuszczowej	0,002	0,000004	0,99
Albumina	0,13	0,02	0,39
Białko	-0,12	0,014	0,42
CEA	0,04	0,0016	0,8
Leptyna	-0,21	0,04	0,15

R – współczynnik korelacji, R² – współczynnik determinacji

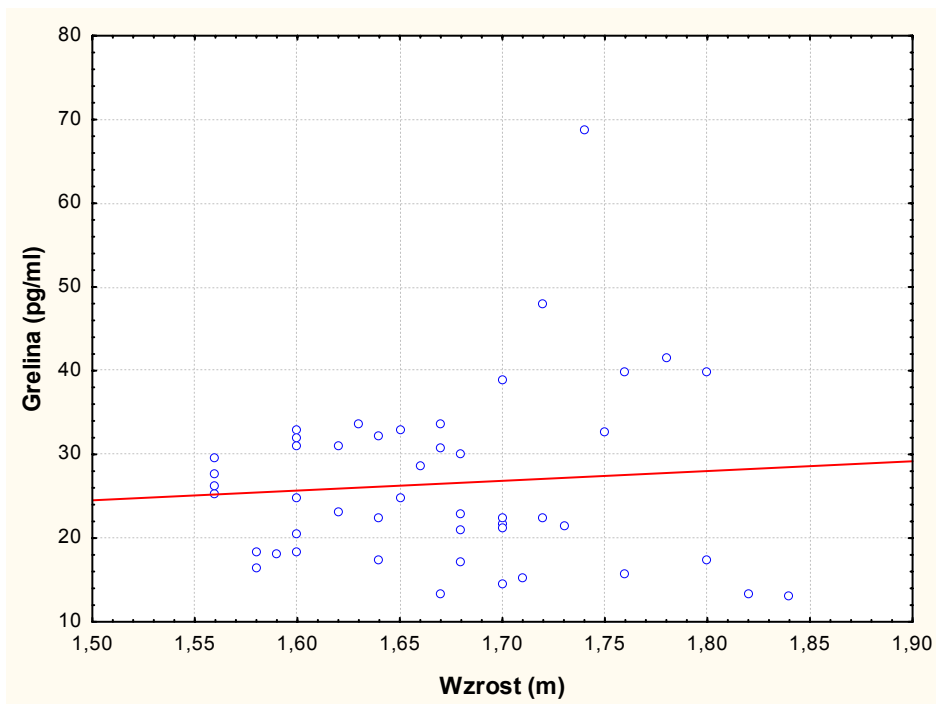
Rysunek 47 do 55 przedstawiają graficzny obraz ww. korelacji.



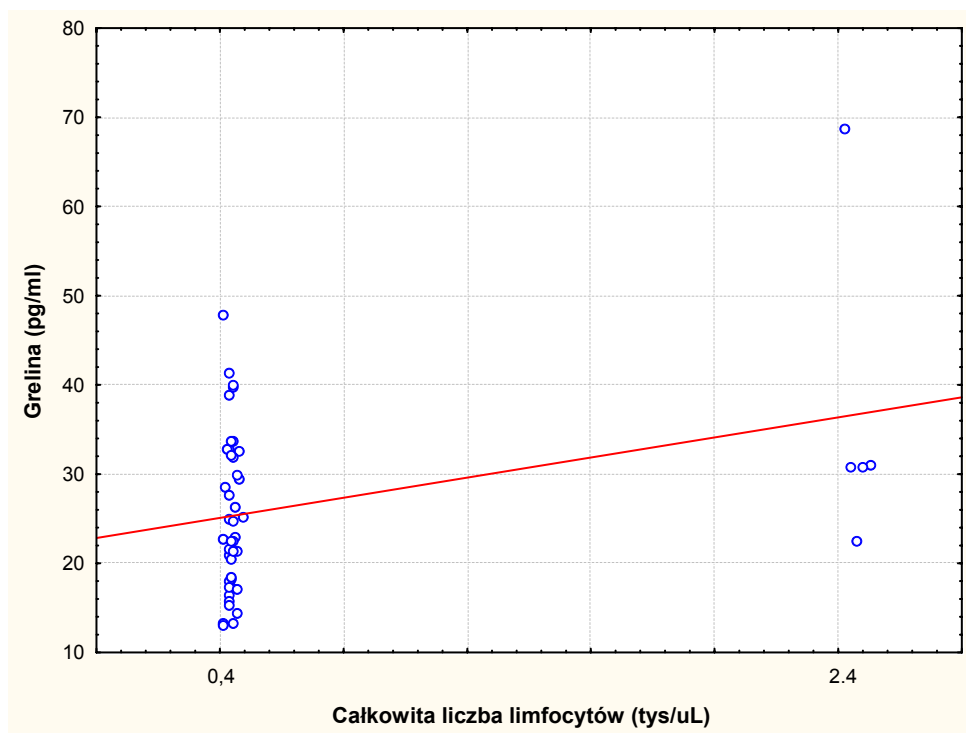
Rysunek 47. Korelacja stężenia greliny na czczo z wiekiem wyrażonym w latach



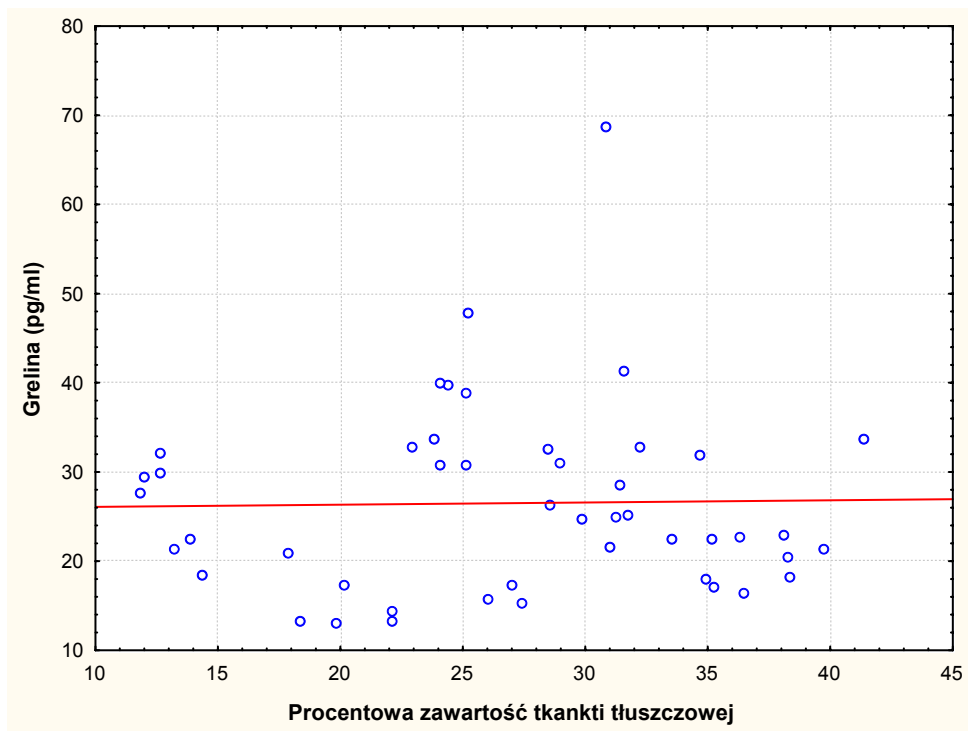
Rysunek 48. Korelacja stężenia greliny na czczo z masą ciała wyrażoną w kilogramach



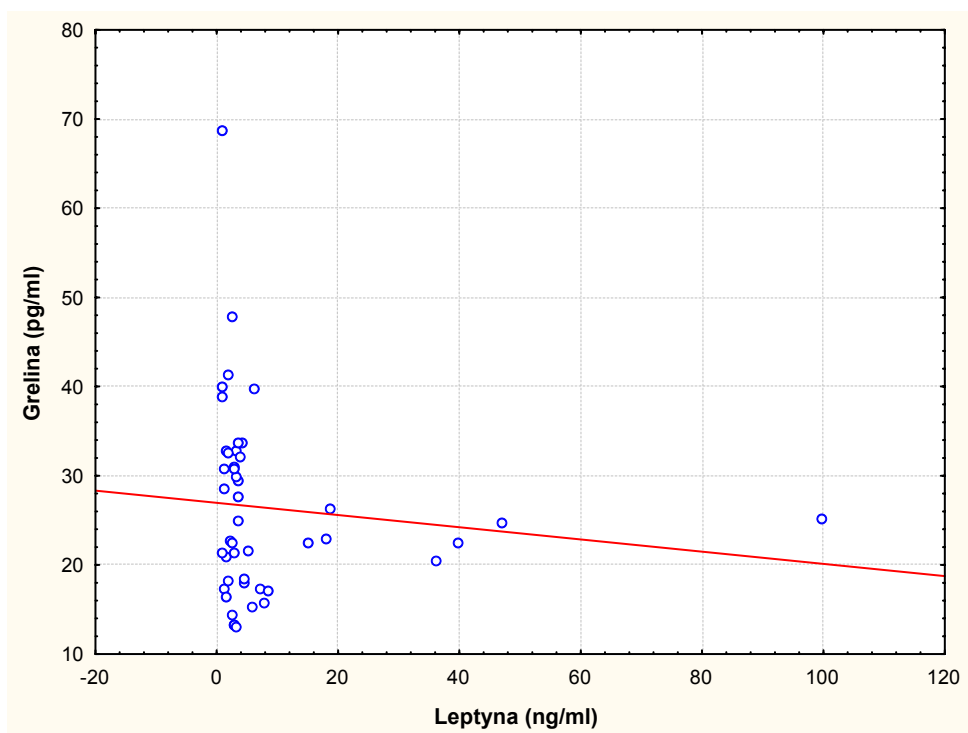
Rysunek 49. Korelacja stężenia greliny na czczo z wzrostem wyrażonym w metrach



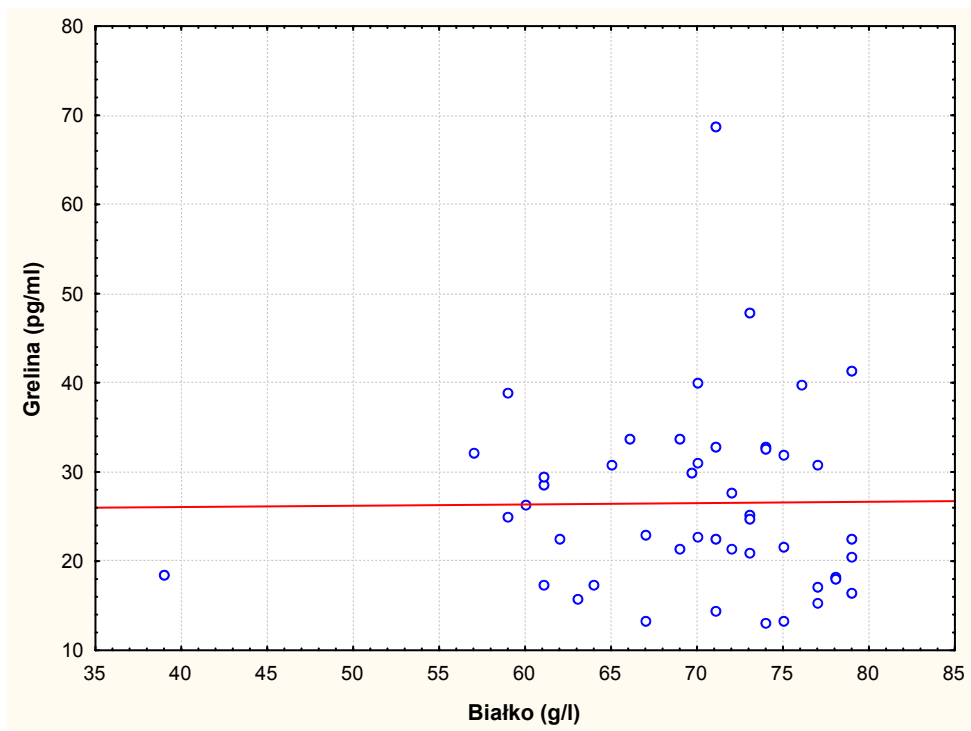
Rysunek 50. Korelacja stężenia greliny na czczo z całkowitą liczbą limfocytów wyrażoną w tys/uL



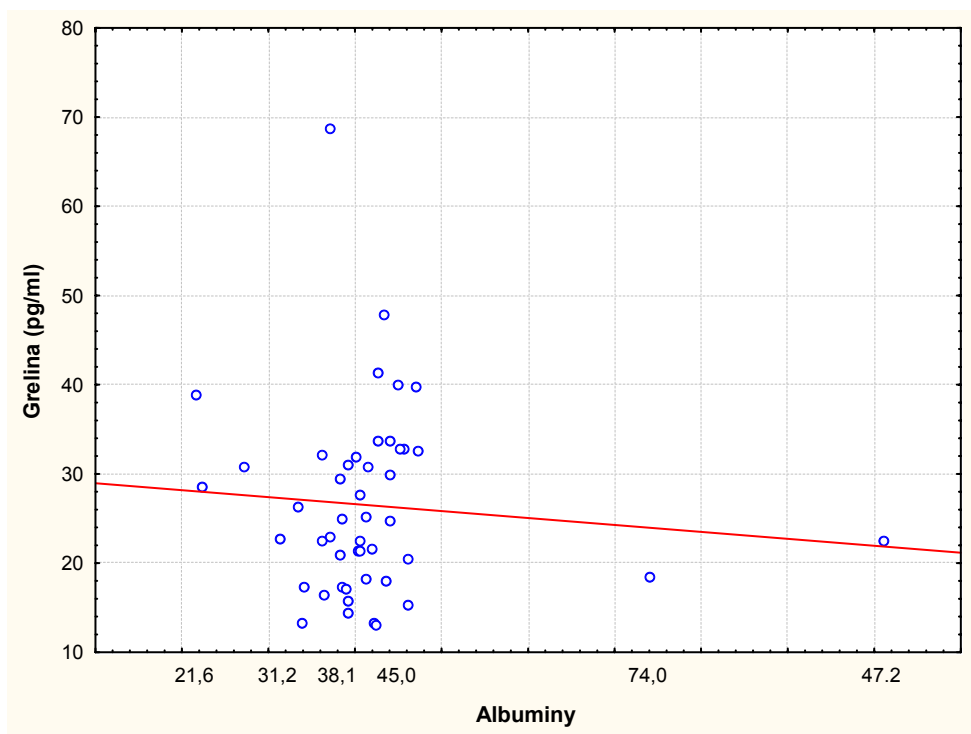
Rysunek 51. Korelacja stężenia greliny na czczo z procentową zawartością tkanki tłuszczowej



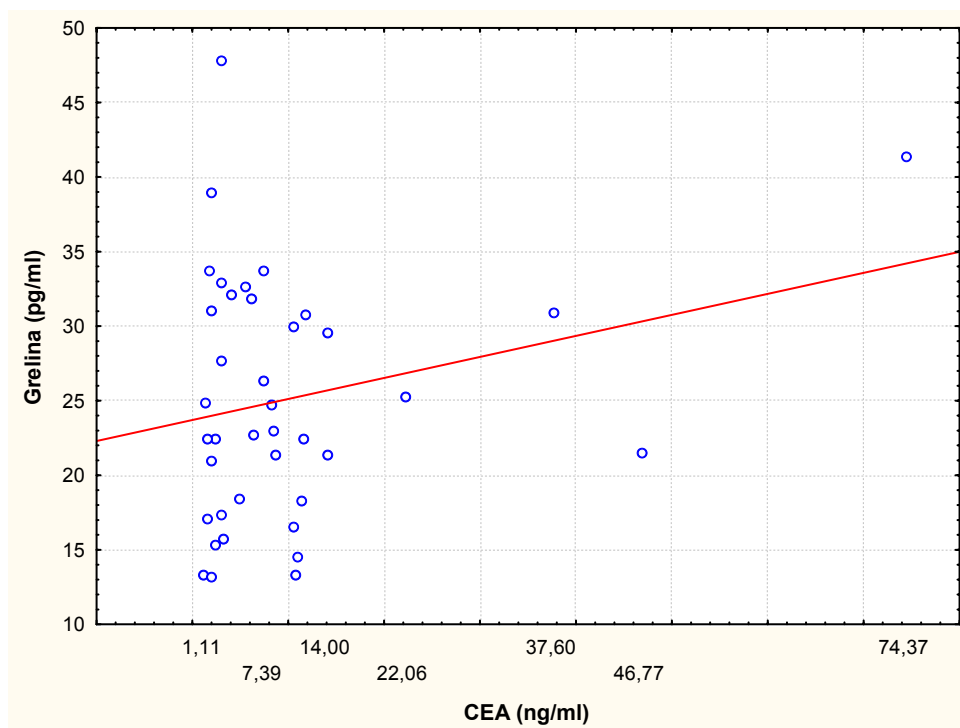
Rysunek 52. Korelacja stężenia greliny na czczo z stężeniem leptyny na czczo



Rysunek 53. Wykres rozrzutu stężenie greliny na czczo a stężenie białka we krwi



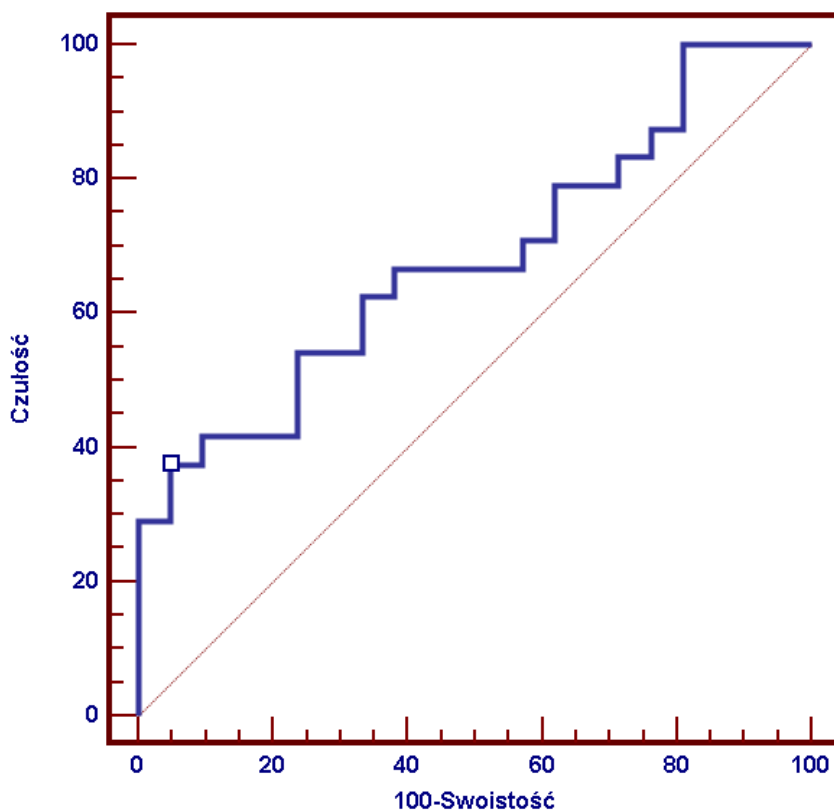
Rysunek 54. Wykres rozrzutu stężenie greliny na czczo a stężenie albuminy (g/l) we krwi



Rysunek 55. Wykres rozrzutu stężenie greliny na czczo a stężenie CEA we krwi

OCENA PRZYDATNOŚCI OZNACZANIA STEŻENIA/ZMIAN STEŻENIA GRELINY W DIAGNOSTYCE RAKA JELITA GRUBEGO

W celu oceny przydatności oznaczenia stężenia greliny na czczo w surowicy krwi w wykrywaniu raka jelita grubego wykonano analizę krzywej ROC dla wszystkich osób badanych oraz oddzielnie dla grupy mężczyzn oraz kobiet. W grupie wszystkich badanych osób oraz w grupie mężczyzn nie uzyskano istotnie statystycznej różnicy w stosunku do losowego doboru pacjentów do grupy rozpoznania (odpowiednio $AUC=0,56$ $p=0,28$ oraz $AUC=0,54$ $p=0,64$). Z kolei w grupie kobiet uzyskano statystycznie znamiennej różnicę - $AUC=0,68$ $p=0,03$. Przy punkcie odcięcia wynoszącym dla stężenia greliny w surowicy krwi $\leq 18,43$ pg/ml uzyskano czułość testu 37,5% (95% przedział ufności 18,8-59,4) oraz swoistość 95,2% (95% przedział ufności 76,1-99,2) przy wskaźniku wiarygodności 7,87 – tabela 35 oraz rysunek 57. Wartość predykcyjna dodatnia tego testu wyniosła 90,0%, a wartość predykcyjna ujemna 57,1%.



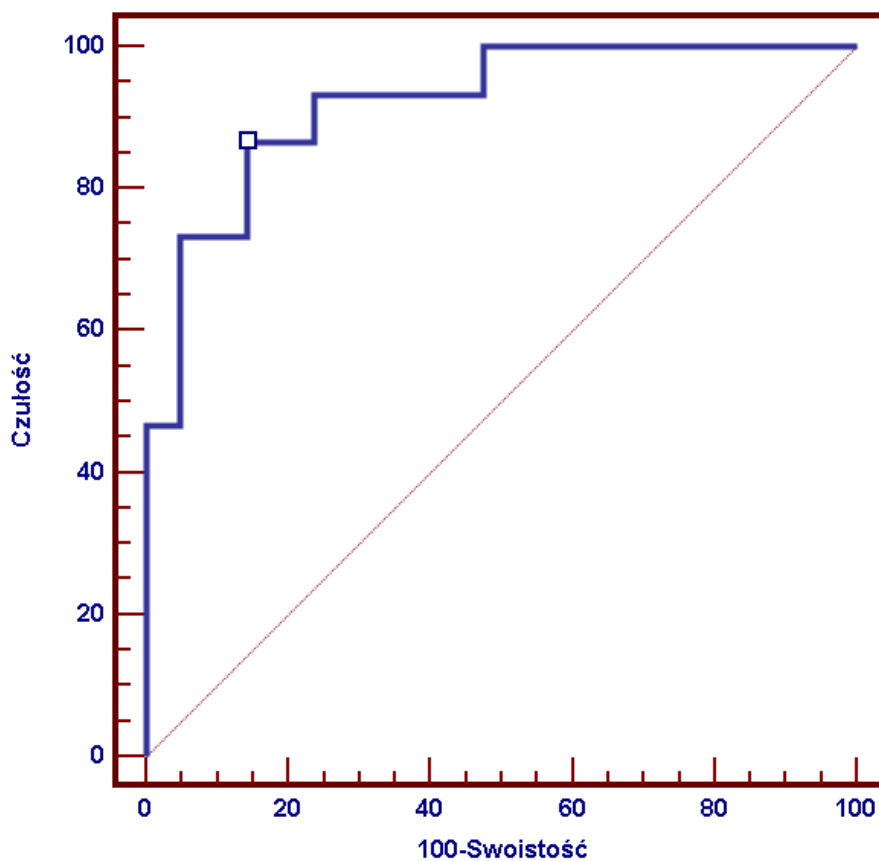
Rysunek 56. Krzywa ROC w grupie kobiet. Zaznaczono punkt odcięcia wynoszący dla stężenia greliny w surowicy krwi $\leq 18,43$ pg/ml uzyskując czułość testu na poziomie 37,5% oraz jego swoistość 95,2%

Z kolei w celu oceny przydatności zmian stężenia greliny po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w wykrywaniu raka jelita grubego wykonano analizę krzywej ROC. W grupie kobiet uzyskano statystycznie znamiennej różnicę - AUC=0,92 $p < 0,001$. Przy punkcie odcięcia dla różnicy stężenia greliny w surowicy krwi po 120 min od podania mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych wynoszącą $\leq 1,68$ uzyskano czułość testu na poziomie 86,7% (95% przedział ufności 59-98) oraz jego swoistość 85,71% (95% przedział ufności 63,6-96,8) przy wskaźniku wiarygodności 6,1 – tabela 35 oraz rysunek 58. Wartość predykcyjna dodatnia tego testu wyniosła 90,3%, a wartość predykcyjna ujemna 55,9%.

Tabela 35. Analiza krzywej ROC w grupie kobiet dla stężenie greliny na czczo [pg/ml] oraz różnicy stężenia greliny w surowicy krwi po 120 min od podania mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych.

	Poziom odcięcia	Czułość [%]	Swoistość [%]	Wskaźnik wiarygodności	AUC	P Value
Stężenie greliny na czczo	$\leq 18,43$ pg/ml	37,5	95,2	7,9	0,68	0,03
Różnica stężenia greliny po 120 min	$\leq 1,68$	86,7	85,7	6,1	0,92	<0,001

* Kolorem czerwonym zaznaczono statystycznie znamienne wyniki.



Rysunek 57. Krzywa ROC w grupie kobiet. Zaznaczono punkt odcięcia dla różnicy stężenia greliny w surowicy krwi po 120 min od podania mieszanki długłańcuchowych kwasów tłuszczowych wynoszącej $\leq 1,68$, uzyskując czułość takiego testu na poziomie 86,7% oraz jego swoistość 85,71% przy wskaźniku wiarygodności 6,1.

VIII. Dyskusja

Zmiany stężenia greliny w grupie kontrolnej oraz w grupie pacjentów z RJG:

Stężenie greliny w surowicy krwi zmniejsza się po przyjęciu posiłku. Jak udowodniły badania, wielkość tego spadku zależy nie tylko od ilości spożytych kalorii ale także od składu posiłku (zawartości procentowej cukrów, tłuszczu oraz białek), płci oraz masy ciała [80]. Badania z użyciem izokalorycznego posiłku wykazały, że tłuszcze najmniej efektywnie hamują poposiłkowy spadek stężenia greliny w porównaniu do cukrów i białek [77]. Ten relatywnie mały spadek może być jednym z mechanizmów powstawania otyłości w skutek spożywania wysokotłuszczowej diety. Co prawda nie wszystkie prace potwierdzają obecność poposiłkowego spadku stężenia greliny po spożyciu tłuszczu to jednak większość autorów dotychczas opublikowanych badań zaobserwowała spadek stężenia tego hormonu w surowicy krwi.

Przeprowadzone badanie zmian stężenia greliny po spożyciu mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie kontrolnej kobiet i mężczyzn potwierdziło doniesienia literaturowe. Heath RB i wsp., stosując identyczną metodologię uzyskali 25% spadek stężenia greliny po doustnym podaniu identycznej mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych [129]. W przeprowadzonym badaniu zarówno w grupie kontrolnej kobiet jak i mężczyzn obserwowano istotny statystycznie spadek średniego stężenia greliny w surowicy krwi po 60 i 120 min (odpowiednio $p=0,001$ i $p=0,01$ oraz $p<0,001$ i $p<0,001$) po spożyciu opisanego wyżej wystandaryzowanego posiłku, który wyniósł średnio 17,1% w grupie kobiet oraz 10,3% w grupie mężczyzn.

Z kolei w grupie chorych z rakiem jelita grubego jedynie w grupie mężczyzn obserwowano istotny statystycznie poposiłkowy spadek średniego stężenia greliny w surowicy krwi po 60 min ($p=0,03$) i 120 min ($p=0,009$), który wyniósł średnio 12%. W grupie kobiet z rakiem jelita grubego po 120 min od doustnego podania mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych spadku takiego nie obserwowano. Wręcz przeciwnie po 60 min obserwowano statystycznie istotny wzrost średniego stężenia greliny w surowicy krwi ($p<0,05$).

Trudno odnieść się tutaj do jakichkolwiek danych w literaturze ponieważ praca ta, zgodnie z dostępną literaturą, jest pierwszym badaniem analizującym zmiany stężenia greliny po podaniu mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie kobiet i mężczyzn z rakiem jelita grubego. Zgodnie z wiedzą autora, nie przeprowadzono również dotychczas

oznaczenia zmian stężenia greliny u chorych z rakiem jelita grubego po podaniu jakiegokolwiek posiłku. W grupie zdrowych ludzi, jak już wspomniano wcześniej, obserwowano brak spadku stężenia greliny po podaniu tłuszczy, ale występował on u większości badanych. Poppitt i wsp. oraz Mohling i wsp., którzy nie obserwowali statystycznie istotnych zmian w stężeniu greliny w surowicy krwi po podaniu tłuszczy, badali jedynie jej zachowanie w grupie odpowiednio 18 oraz 8 zdrowych mężczyzn. Ponadto, w pierwszym badaniu autorzy podawali dwa rodzaje posiłku wysokotłuszczowego, o wysokiej i niskiej zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych. Po obu rodzajach posiłków następował co prawda spadek stężenia greliny w surowicy krwi, ale był on statystycznie nieistotny. Ponadto, nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w zachowaniu stężenia greliny po obu posiłkach. W żadnym z badań nie obserwowano jednak statystycznie istotnego wzrostu stężenia greliny po 60 min od podania ww. posiłków [244, 245]. Z kolei Erdmann i wsp. obserwowali wzrost stężenia greliny w grupie sześciu zdrowych kobiet i ośmiu zdrowych mężczyzn, zarówno po spożyciu wysokotłuszczowego jak i wysokobiałkowego posiłku. Wzrost ten następował w ciągu pierwszych 45 min, a następnie poziom greliny powracał do wartości wyjściowych w ciągu 120 min od rozpoczęcia posiłku. Jedynie po spożyciu cukrów obserwowano spadek stężenia greliny. Wyniki tego badania są najbardziej zbliżone do obserwowanej w grupie kobiet z rakiem jelita grubego zmian średniego stężenia greliny. Autorzy nie przedstawili jednak oddzielnych wyników jak wyglądała ta sytuacja w grupie kobiet i mężczyzn. Ponadto, badana populacja składała się z osób zdrowych. Należy jednak zaznaczyć, że badanie to, choć przeprowadzone na małej liczbie osób, miało bardzo dobrą metodykę [81].

Podobny brak spadku stężenia greliny po posiłku obserwowano również w grupie zdrowych dzieci. Autorzy tego badania analizowali zmiany stężenia greliny w surowicy krwi po spożyciu lekkiego śniadania (400 kcal, 45% węglowodanów, 13% białek oraz 42% tłuszczy) w grupie 10 zdrowych dzieci (3 chłopców, 7 dziewczynek) w wieku $8,5 \pm 1,3$ lat oraz w grupie 19 dorosłych osób (10 mężczyzn i 9 kobiet) w wieku $28,5 \pm 3,4$ lat. Stężenie greliny na czczo nie różniło się statystycznie istotnie pomiędzy grupami. Jednak po podaniu posiłki spadek stężenia greliny obserwowano jedynie w grupie dorosłych. Brak jednak szczegółowych danych jakie było stężenie oraz zmiany stężenia greliny w grupie kobiet i mężczyzn [72].

Większość autorów obserwowała jednak istotny statystycznie spadek stężenia greliny po doustnym lub dożylnym podaniu tłuszczy. Oczywiście trudno jest porównać otrzymane wyniki z niektórymi pracami ponieważ ich metodologia (kryteria włączenia i wyłączenia,

skład posiłku, technika pobrania krwi, wykorzystanie innych przeciwciał do oznaczeń stężenia greliny) oraz brak niektórych danych uniemożliwia odpowiednią analizę danych. To jednak jeszcze raz warto wspomnieć, że w pracy Heath RB i wsp., na której częściowo wzorowano metodologię tego badania, stosując identyczną mieszaninę długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, obserwowano istotny statystycznie spadek stężenia greliny. Należy jednak zaznaczyć, że również i w tej pracy nie podano wyników oddzielnie dla grupy kobiet i mężczyzn [129].

Tabela 35 prezentuje wyniki dotychczas opublikowanych badań zmian stężenia greliny w surowicy krwi po doustnym lub dożylnym podaniu różnego rodzaju posiłków.

Tabela 36. Zestawienie prac badających zmiany stężenia greliny po podaniu różnego rodzaju posiłków w grupie zdrowych osób

Autor pracy	Ilość osób	Zawartość energetyczna	Skład	Stężenie greliny
Mohling i wsp. (2002)	5 mężczyzn	b.d.	T: 20% i.v. W: 0g, B: 0g	Bez statystycznie istotnych zmian w ciągu 2h
Monteleone i wsp. (2003)	14 kobiet	840kJ	T: 17g (85%) W: 8g (15%) B: 5g (10%)	Statystycznie znamienne spadek w ciągu 3h
Erdman i wsp. (2004)	8 mężczyzn 6 kobiet	13,5 kJ/g	T: 85,5% W: 0% P: 14,5%	Statystycznie znamienne wzrost w ciągu 45 min
Greenman i wsp. (2004)	13 kobiet / 11 mężczyzn	1506kJ	T: 40g (100%) W:0g, B: 0g	Statystycznie znamienne spadek
Heath RB i wsp. (2004)	4 kobiety 4 mężczyzn	466 kJ	T: 50g W: 0g, B:0g	Statystycznie znamienne spadek stężenia greliny
Poppitt i wsp. (2006)	18 mężczyzn	3100kJ	T: 59g (71%) W: 45g (23%) B: 9g (5%)	Statystycznie niezamienne spadek
Kenig (2008)	16 mężczyzn 15 kobiet	466 kJ	T: 50g W: 0g, B: 0g	Statystycznie znamienne spadek stężenia greliny

T- tłuszcze, W – węglowodany, B – białka, b.d. – brak danych

Jednym z prawdopodobnych wytłumaczeń takiego zachowania się stężenia greliny w surowicy krwi w badanej grupie kobiet z rakiem jelita grubego, które nie jako narzuca się na wstępie, jest wpływ hormonów płciowych. U kobiet przed menopauzą wydzielanie tych hormonów jest ściśle regulowane przez sprzężenie zwrotne z przysadką i podwzgórzem. Z kolei wśród kobiet po menopauzie estrogeny są głównie produkowane przez konwersję

androstendionu w tkankach obwodowych – między innymi właśnie w tkance tłuszczowej. Produkcja ta nie podlega jednak żadnej regulacji. Wzajemne oddziaływanie tych hormonów jest dwukierunkowe. Jak zostało to opisane w wstępie, grelina może działać w sposób pośredni i/lub bezpośredni na tkankę tłuszczową między innymi zwiększając jej masę. Z kolei wiele komórek wydzielających grelinę posiada na powierzchni receptory dla hormonów płciowych. Sprawdzenie tej teorii wymaga jednak oznaczenia stężenia/zmian stężenia tych hormonów we krwi pacjentek z RJG.

Drugim wytłumaczeniem może być opisywany w niektórych badaniach brak poposiłkowego spadku stężenia greliny w grupie ludzi otyłych. English i wsp. nie obserwowali spadku stężenia greliny po posiłku właśnie w tej grupie ludzi, co może być wynikiem zmniejszenia stężenia tego hormonu na czczo u osób otyłych [246]. W przeprowadzonym badaniu porównano wskaźnik masy ciała pacjentów w grupie kobiet i mężczyzn i choć średni wskaźnik w grupie kobiet był większy w porównaniu do grupy mężczyzn ($26,0 \text{ kg/m}^2$ vs. $23,3 \text{ kg/m}^2$) to różnica ta była jednak statystycznie nieistotna. Z kolei porównanie zmian stężenia greliny po spożyciu mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych pomiędzy grupą kobiet o prawidłowej masie ciała i z nadwagą/otyłością nie wykazało statystycznie istotnych różnic. Co prawda w grupie kobiet z nadwagą/otyłością obserwuje się statystycznie istotny spadek stężenia greliny w surowicy krwi po 120 min ale względem stężenia po 60 min, kiedy to nastąpił istotny statystycznie wzrost jej stężenia w stosunku do poziomu wyjściowego. Brak jest istotnie statystycznego spadku stężenia greliny po 120 min od podania mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych zarówno w grupie kobiet z prawidłową masą ciała jak i z nadwagą/otyłością. Ponadto, w badaniu English i wsp. grupa ludzi otyłych miała średni wskaźnik masy ciała wynoszący $42,8 \text{ kg/m}^2$ ($31,9\text{-}57,5$), znacznie przewyższający średnie BMI grupy badanej. W tym badaniu nie zaprezentowano również zmian stężenia greliny z podziałem na płeć [246].

Kolejnym wytłumaczeniem może być również wpływ samego guza na stężenie greliny. Jak zostało to opisane we wstępie istnieje wiele dowodów, że grelina może uczestniczyć w karcynogenezie wielu nowotworów. Do wyjaśnienia mechanizmu takiego zachowania się greliny w tej grupie pacjentów potrzebne są jednak dalsze badania innych hormonów wchodzących w interakcję z greliną, a będących jej możliwymi regulatorami, na dużo większej liczbie pacjentów.

Z kolei analizując tabelę 13 przedstawiającą procentowy udział podgrup składających się z osób u których stężenie greliny wzrosło, spadło lub nie zmieniło się po 60 i 120 min po doustnym przyjęciu mieszaniny kwasów tłuszczowych w stosunku do stężenia wyjściowego

(na czczo) można zauważyć, że mimo, że większość wyników w grupie kobiet z RJG nie zmniejsza się to istnieje niejednorodność w grupie. Po 60 min od przyjęcia mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych jedynie u 13,3% pacjentek dochodziło do spadku stężenia greliny, po 120 min odsetek ten wyniósł 40%. Należy jednak podkreślić, że różnica w stężeniu greliny w tej podgrupie nie była statystycznie istotna i wyniosła 1,7 z zakresem 0,14 - 4,76. Z kolei w grupie mężczyzn stężenie greliny w surowicy krwi wzrastało u 18,75% po 60 min oraz 25% pacjentów po 120 min od podania mieszaniny kwasów tłuszczowych. W tym przypadku również różnica ta była statystycznie nieistotna i wynosiła 1,1 z zakresem 0,16-2,61. Dla porównania w grupie kontrolnej kobiet po 120 min po doustnym przyjęciu mieszaniny kwasów tłuszczowych przewidywany spadek stężenia greliny następował u 100% badanych osób. W grupie kontrolnej mężczyzn odsetek ten wyniósł 87,5%. Porównując wyniki pomiędzy grupą kontrolną, a chorych z RJG zauważa się znaczny wzrost niejednorodności wyników.

Z kolei porównując zmiany średniego stężenia greliny na czczo w surowicy krwi przed oraz w 7. dniu po zabiegu operacyjnym w grupie mężczyzn nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy. W grupie kobiet z rakiem jelita grubego obserwowano statystycznie znamienne wzrost stężenia greliny w 7. dobie po zabiegu operacyjnym, ale po usunięciu wyników pacjentek u których zabieg nie był radykalny (wykonano zespolenie omijające) nie uzyskano statystycznie znamiennej różnicy w pooperacyjnym stężeniu greliny. Nie jest to zadziwiające ponieważ zgodnie z opublikowanymi pracami ilość komórek produkujących grelinę maleje w kierunku dystalnym przewodu pokarmowego [41]. Można przypuszczać, że wycięcie części lub całości jelita grubego może mieć mały wpływ na całkowite stężenie greliny, a spadek ten może zostać w ciągu tych paru dni skompensowany przez wzrost produkcji w pozostałych komórkach. Potwierdzeniem tej teorii mogą być wyniki niedawno opublikowanej pracy Stratis i wsp. Badali oni wpływ operacji restrykcyjno-malabsorpcyjnej jaką jest wyłączenie żółciowo-trzustkowe w grupie otyłych pacjentów na stężenie greliny w surowicy krwi. Jako grupę kontrolną wykorzystali właśnie pacjentów z rakiem jelita grubego u których wykonano częściową resekcję jelita grubego. Grupa ta składała z 13 pacjentów (6 mężczyzn i 7 kobiet), średnia wieku 58 lat (zakres 50-70 lat) z średnim wskaźnikiem masy ciała 26 kg/m^2 (zakres $21\text{-}31 \text{ kg/m}^2$). Wśród tych 13 chorych, 10 miało raka okrężnicy, a 3 raka odbytnicy, zawiązanie A oraz B w skali Duke'a w modyfikacji Astlera i Colera. Wszyscy chorzy byli operowani - wykonano 5 prawych i 3 lewe hemikolektomie, 2 sigmoidektomie oraz 3 przednie resekcje odbytnicy. Grupa ta przypominała więc w dużym stopniu grupę pacjentów przeprowadzonego badania. Autorzy

oznaczali poziom greliny w surowicy krwi przed operacją, a następnie w 1., 3. i 7. dobie oraz 1 i 3 miesiące po operacji. Stężenie greliny było statystycznie istotnie niższe w 1. i 3. dobie pooperacyjnej aby w 7. dobie oraz w czasie kolejnych badań osiągnąć poziom nie różniący się statystycznie istotnie od stężenia przedoperacyjnego. Podobne wyniki otrzymano w przeprowadzonym badaniu. Niestety autorzy nie podali oddzielnych wyników zmian stężenia greliny w grupie kobiet i mężczyzn oraz jej zależności od typu wykonanej operacji [247].

Analizując wyniki stężenia greliny przed oraz w 7. dobie po zabiegu operacyjnym w zależności od typu operacji nie obserwuje się również statystycznie istotnych różnic pomiędzy rodzajami zabiegu. Zgodnie z wynikami cytowanej poprzednio pracy Stratis i wsp. oraz w świetle wyników obecnego badania, należałoby wykonać te oznaczenia w czasie pierwszych paru dni po operacji.

Stężenie greliny na czczo w grupie kontrolnej oraz w grupie pacjentów z RJG:

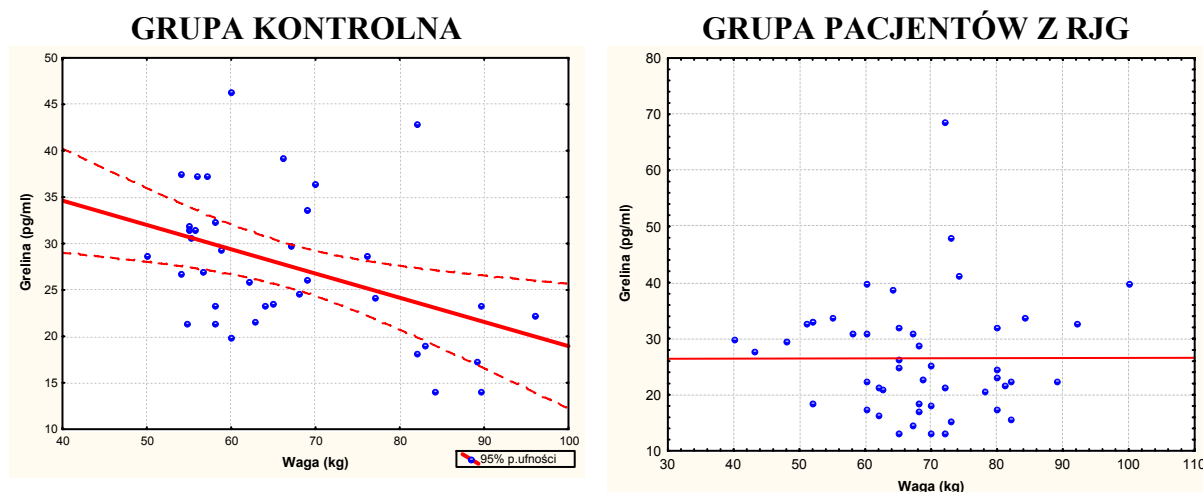
Wyniki opublikowanych badań dotyczących zależności stężenia greliny w surowicy krwi od płci i wieku są nadal niejednoznaczne. Badania, które wskazywały na zależność stężenia greliny od wieku były wykonywane w grupie dzieci. W większości opublikowanych badań w grupie dorosłych osób podobnej zależności nie obserwowano [248, 249]. W przeprowadzonym badaniu zarówno w grupie kontrolnej jak i pacjentów z rakiem jelita grubego nie wykazano korelacji stężenia greliny z wiekiem.

Jak już również wspomniano w wstępie część opublikowanych prac nie wykazywała różnicy poziomu greliny pomiędzy płciami [73,74,75]. Z kolei w wielu pracach obserwowano statystycznie znamienne wyższy poziom greliny na czczo wśród kobiet [76,77]. W pierwszej pracy, Ariel i wsp. obserwowali, statystycznie istotne, trzykrotnie wyższe stężenie greliny w surowicy krwi u zdrowych kobiet, w późnej fazie folikularnej cyklu miesięczkowego, w porównaniu do grupy zdrowych mężczyzn [76]. W przeprowadzonym badaniu obserwowano wyższe stężenie greliny na czczo w grupie kontrolnej kobiet w porównaniu do zdrowych mężczyzn. Różnica ta była jednak statystycznie nieistotna. Kobiety w grupie kontrolnej były jednak w różnym wieku, zarówno miesiączkujące jak i w okresie menopauzy. Nie brano również pod uwagę fazy cyklu menstruacyjnego. Z kolei w drugiej pracy, Akamizu i wsp. przeprowadził badania w grupie osób w wieku 21-61 lat, zarówno kobiet jak i mężczyzn. Obserwował on również statystycznie wyższe stężenie greliny w surowicy krwi w grupie zdrowych kobiet w porównaniu do grupy zdrowych mężczyzn [77]. Brak jest jednak danych szczegółowych odnośnie wieku samych kobiet. Nie brał on również pod uwagę fazy cyklu miesięczkowego. Ponadto, grupę badaną stanowiły osoby pochodzenia japońskiego, a w

literaturze brak jest obecnie badań porównujących ewentualne różnice rasowe w stężenie greliny w surowicy krwi. Greenman i wsp. obserwowali również statystycznie znamienne wyższy poziom stężenia greliny w surowicy krwi u kobiet w porównaniu do mężczyzn. Stężenie to było statystycznie istotnie wyższe zarówno na czczo jak i po doustnym podaniu glukozy i tłuszczu [250]. W przeprowadzonym badaniu obserwowano podobne zjawisko po podaniu mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Różnica ta nie była jednak statystycznie istotna. Wyższe stężenie greliny w grupie zdrowych kobiet może wynikać z wyższego stężenia innych hormonów regulujących apetyt takich jak leptyna w porównaniu do grupy mężczyzn [251]. Ponadto, obserwuje się w grupie kobiet wyższe stężenie innych hormonów, takich jak hormon wzrostu i prolaktyna, mających wpływ na poziom greliny w surowicy krwi [252].

Interesujący jest jednak fakt, że w badanej grupie chorych z RJG dochodzi do odwrotnej sytuacji. U mężczyzn obserwowano wyższy poziom greliny w surowicy krwi w porównaniu do grupy kobiet z RJG. Różnica ta jest jednak statystycznie nieistotna. Z kolei porównując średnie stężenie greliny na czczo w grupie kobiet zdrowych oraz z rakiem jelita grubego obserwuje się statystycznie istotną różnicę ($p < 0,05$). W grupie mężczyzn różnica ta jest statystycznie nieistotna. Po przeprowadzeniu standaryzacji i usunięciu czynnika zakłócającego w postaci masy ciała obserwowano nadal statystycznie istotną różnicę. Można w takim razie przypuszczać, że za taką różnicę w stężeniu greliny na czczo w surowicy krwi pomiędzy grupą zdrowych kobiet oraz z rakiem jelita grubego, może być odpowiedzialny wpływ choroby nowotworowej. Na podstawie dotychczas przeprowadzonych i opublikowanych badań trudno jest jednak obecnie jednoznacznie wyjaśnić to zjawisko.

Analizowano również korelację stężenia greliny na czczo w surowicy krwi z masą ciała osób badanych. Jak udowodniono w wielu wcześniej przeprowadzonych badaniach, ryzyko raka jelita grubego wzrasta wraz z wzrostem masy ciała zarówno u kobiet jak i mężczyzn. W porównaniu do grupy ludzi z prawidłową masą ciała u osób z nadwagą następuje wzrost ryzyka zachorowania na raka jelita grubego 1,15 razy, a w grupie ludzi otyłych 1,33 razy [253]. W przeprowadzonym badaniu w grupie zdrowych osób obserwowano statystycznie istotną ujemną korelację stężenia greliny z masą ciała, a co za tym idzie również wskaźnikiem BMI. Wyniki te są zgodne z obserwacjami innych autorów opublikowanych prac [125, 254]. Z kolei w grupie pacjentów z rakiem jelita grubego takiej korelacji nie obserwowano – rysunek 57.



Rysunek 58. Wykres rozrzutu stężenia greliny na czczo oraz masy ciała wyrażonej w kilogramach w grupie kontrolnej oraz chorych na RJG

Brak korelacji stężenia greliny w surowicy krwi na czczo z wskaźnikiem BMI obserwowali również Shimizu i wsp., którzy badali pacjentów z rakiem płuc, zarówno drobno- i niedrobno-komórkowym [200]. Prawdopodobnie zmiany w organizmie związane z obecnością nowotworu mogą zaburzać tę zależność.

Z kolei analiza różnic stężenia greliny pomiędzy grupą pacjentów z rakiem jelita grubego z nadwagą/otyłością ($BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ wg WHO) oraz grupą pacjentów z prawidłową masą ciała wykazała również, podobnie jak w dotychczas opublikowanych pracach, niższy poziom greliny w drugiej grupie. Różnica ta jest jednak statystycznie nieistotna. Brak obserwowanej w innych pracach istotnej statystycznie różnicy może być spowodowany faktem, że jedynie niewielki procent pacjentów z RJG miało wskaźnik masy ciała $> 30 \text{ kg/m}^2$, a jego wartość, za wyjątkiem jednej osoby, tylko nieznacznie przekraczała dolną granicę zakresu. I tak w grupie kobiet z RJG 4 pacjentki miały wskaźnik masy ciała $> 30 \text{ kg/m}^2$ – odpowiednio 30,47; 30,48; 31,25; 33,09 kg/m^2 . Z kolei w grupie mężczyzn z RJG wskaźnik ten przekroczył 30 kg/m^2 jedynie u 2 pacjentów - odpowiednio 30,04 oraz 31,62 kg/m^2 .

Niektóre badania na modelach zwierzęcych wykazały, że grelina zwiększa masę ciała ale tylko przez wzrost masy tkanki tłuszczowej [149]. W przeprowadzonym badaniu nie stwierdzono statystycznie istotnej korelacji stężenia greliny w surowicy krwi na czczo z procentową zawartością tkanki tłuszczowej mierzonej za pomocą bioimpedancji. Z kolei Fouladiun i wsp obserwowali istotną statystycznie korelację stężenia greliny z masą tkanki tłuszczowej. Wykorzystywali oni jednak metodę podwójnej wiązki promienia rentgenowskiego (DEXA – dual-energy X-ray absorptiometry), która jest uważana za metodę

bardziej dokładną w porównaniu do zastosowanej w badaniu bioelektrycznej impedancji. Porównanie grup utrudnia również fakt, że w opublikowanej pracy analizowano wyniki pacjentów z różnymi nowotworami. Badali oni jednak chorych poddanych leczeniu paliatywnemu z różnymi nowotworami z obecnymi przerzutami regionalnymi i odległymi [255].

Stężenie greliny na czczo w surowicy krwi a wybrane czynniki charakteryzujące guz:

Z kolei porównując przedoperacyjne średnie stężenia greliny w surowicy krwi na czczo w grupach podzielonych ze względu na charakterystykę guza nie obserwuje się istotnych statystycznie różnic stężenia greliny odnośnie lokalizacji guza, zaawansowania miejscowego guza (pT), stopnia zajęcia regionalnych węzłów chłonnych (pN), braku lub obecności komórek raka śluzotwórczego, stopnia zróżnicowania komórek (G) oraz stopnia zaawansowania wg klasyfikacji Dukesa w modyfikacji Astlera i Collera. Trudno odnieść się tutaj do jakichkolwiek danych w dostępnej literaturze ponieważ nie przeprowadzono dotychczas podobnie szczegółowej analizy zarówno u chorych z rakiem jelita grubego jak i innymi nowotworami. Co prawda Stratis i wsp. badali stężenie greliny w surowicy krwi w grupie pacjentów z rakiem jelita grubego w stadium zaawansowania A i B w skali Dukesa w modyfikacji Astlera i Colera, to jednak grupa ta stanowiła grupę kontrolną dla oceny pooperacyjnego stężenia greliny w surowicy krwi pacjentów po operacjach restrykcyjno-malabsorbujących u osób otyłych. Ponadto, prezentując wyniki nie porównywali ewentualnych różnic w stężeniu greliny pomiędzy grupami o różnym stadium zaawansowania RJG [247]. Z kolei Fouladiun i wsp. badali chorych poddanych leczeniu paliatywnemu z różnymi nowotworami, między innymi z rakiem jelita grubego, w stadium zaawansowania T4N1M1. Autorzy tego badania nie podali jednak wyników stężenia greliny w surowicy dla poszczególnych nowotworów, a jedynie korelację średniego stężenia greliny w surowicy krwi z różnymi czynnikami, które omówiono powyżej [256].

Analizując szczegółowo wyniki dotyczące porównania stężenia greliny w podgrupach pacjentów z różnym stopniem zajęcia regionalnych węzłów chłonnych (pN) można stwierdzić, że mogą one nie do końca odzwierciedlać rzeczywistość. W grupie pacjentów bez zajęcia węzłów chłonnych mogą znajdować się osoby z mikroprzerzutami, których wykrycie przy pomocy konwencjonalnych metod nie jest możliwe oraz osoby, które mają niewykryte przerzuty w węzłach chłonnych z powodu przebadania zbyt małej ich ilości. Zgodnie obecnymi wytycznymi oceny histopatologicznej aby móc stwierdzić brak przerzutów w

regionalnych węzłach chłonnych należ przebadac co najmniej 12 węzłów. W przypadku niektórych pacjentów biorących udział w badaniu, przebadano ich mniejszą ilość.

Z kolei analizując szczegółowo różnice w stężeniu greliny w surowicy krwi w danej lokalizacji guza w aspekcie płci można jednak zauważyć statystycznie istotnie mniejsze średnie stężenie greliny w grupie kobiet w stosunku do mężczyzn z rakiem jelita grubego zlokalizowanym w okrężnicy. Z kolei w grupie mężczyzn obserwuje się zmniejszenie średniego stężenia greliny związane z lokalizacją guza od strony prawej w kierunku odbytnicy, tak że stężenie tego hormonu przy lokalizacji odbytniczej jest niższe w porównaniu do grupy kobiet. Różnica ta jest jednak statystycznie nieistotna.

Z kolei szczegółowa analiza zależności stężenia greliny w surowicy krwi od stopnia zróżnicowania komórek RJG wykazała zmniejszanie się stężenia greliny wraz z zmniejszaniem stopnia zróżnicowania komórek RJG. Różnica ta jest jednak również statystycznie nieistotna. W przypadku również tych czynników trudno odnieść się tutaj do jakichkolwiek danych w dostępnej literaturze ponieważ praca ta, zgodnie z dostępną literaturą, jest pierwszym badaniem porównującym stężenie greliny w surowicy krwi w zależności od stopnia zróżnicowania nowotworu, braku lub obecności komórek raka śluzotwórczego w grupie kobiet i mężczyzn z rakiem jelita grubego.

Niskie stężenie greliny w surowicy krwi występuje zarówno w otyłości jak i insulinooporności, dwóch czynnikach ryzyka raka jelita grubego. Przyjmując, że grelina działa ochronnie na komórki organizmu, można przyjąć, że spadek poziomu tego hormonu w otyłości może przyczynić się do rozwoju raka jelita grubego. Teoria ta znajduje również częściowe potwierdzenie w wynikach tego badania ale tylko w przypadku grupy kobiet. Wraz z zwiększeniem zaawansowania nowotworu oraz zmniejszeniem stopnia zróżnicowania komórek obserwuje się tendencję do spadku poziomu greliny w surowicy krwi. Za tą teorią przemawiają również wyniki wielu badań, który wykazywały, że ograniczenie ilości spożywanych kalorii wiąże się z mniejszą zachorowalnością na nowotwory [257,258]. Redukcja ilości spożywanych kalorii prowadzi do wzrostu stężenia greliny, która, zgodnie z ww. założeniem, miałyby działać ochronnie. Ponadto, ciekawą obserwacją jest fakt, że grelina jak udowodniono w badaniach może hamować proliferację komórek. Maccarinelli i wsp. zaobserwowali, że grelina stymulowała proliferację osteoblastów tylko przy niskich stężeniach. Wysokie stężenia greliny w surowicy krwi pozostawały bez wpływu na proliferację. Może to świadczyć o tym, że stężenie greliny może być odwrotnie proporcjonalne do agresywności guza i jego dalszej progresji. Ta teoria znajduje również częściowe potwierdzenie w przeprowadzonym badaniu w grupie kobiet. Wraz z progresją

guza oraz zmniejszeniem zróżnicowania komórek stężenie greliny zmniejszało się. Ponadto, badanie stężenia greliny w innych nowotworach wykazały, że wyższe stężenia greliny działały protekcyjnie przed rozwinięciem się raka gruczołowego przełyku ale jedynie w grupie osób z nadwagą [259].

Analiza przydatności oznaczenia stężenia greliny w surowicy krwi w wykrywaniu RJG

Analiza krzywej ROC wykazała, że jedynie w grupie kobiet stężenie greliny na czczo w surowicy krwi może być predyktorem RJG. Optymalną wartością graniczną jest stężenie greliny mniejsze lub równe 18,4 pg/ml. Wyznaczona wartość charakteryzowała się niską czułością (37,5%) oraz wysoką swoistością (95,2%). Przy wskaźniku wiarygodności 7,87 można stwierdzić, że zgodnie z zasadami EBM badanie to jest przydatne w wykluczaniu choroby w grupie kobiet. Analizując jednak otrzymany wynik pola pod krzywą ROC w tej grupie (AUC=0,681) to stwierdza się ogólne słabe własności różnicujące tego badania.

Znacznie lepsze wyniki uzyskano analizując krzywą ROC dla różnicy stężenia greliny w surowicy krwi po 120 min od podania 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. W tym wypadku optymalną wartością graniczną jest różnica stężenia mniejsza lub równa 1,81. Wartość ta charakteryzowała się w miarę wysoką czułością (86,7%) oraz swoistością (85,71%). Zgodnie z zasadami EBM, przy wskaźniku wiarygodności na poziomie 6,1 można stwierdzić, że badanie to jest przydatne w wykrywaniu raka jelita grubego w grupie kobiet. Ponadto analiza pola pod krzywą ROC w tej grupie (AUC=0,72) wykazała średnie własności rozróżniające tego badania. Trudno odnieść się tu do jakichkolwiek publikacji ponieważ, zgodnie z wiedzą autora, jest to pierwsza praca analizująca przydatność oznaczenia stężenia/zmian stężenia greliny w surowicy krwi w wykrywaniu RJG.

W przeprowadzonym badaniu oznaczano jednak jedynie stężenie całkowitej greliny w surowicy krwi, na który składa się poziom acylowanej i desacylowanej greliny. Kontynuując badanie należałoby również sprawdzić stosunek acylowanej do desacylowanej greliny w tej grupie chorych. Obecnie jest tylko niewiele opublikowanych prac dotyczących tych form greliny ze względu na dużą niestabilność acylowanej formy w surowicy krwi *in vitro*, a co za tym idzie, szybki jej rozkład utrudniający jej przechowywanie oraz prawidłowe oznaczenie.

Przeprowadzone badanie, zgodnie z dostępną literaturą, jest pierwszą pracą analizującą zmiany stężenia greliny w surowicy krwi po podaniu mieszaniny kwasów tłuszczowych u chorych z rakiem jelita grubego, przydatność oznaczenia stężenia greliny w surowicy krwi w wykrywaniu RJG oraz tak szeroko analizującą stężenie greliny pacjentów z różnym stopniem zaawansowania raka jelita grubego przed i po zabiegu operacyjnym w

grupie kobiet oraz mężczyzn. Pytanie, które nadal pozostaje jednak bez odpowiedzi wymagając dalszych badań, to czy greliny i jej stężenie mają wpływ na karcynogenezę raka jelita grubego, czy jest tylko rezultatem wpływu nowotworu na metabolizm organizmu.

IX. WNIOSKI

1. Grelina może być jednym z pierwotnych czynników ryzyka rozwoju raka jelita grubego u kobiet, ponieważ stwierdzono różnicę jej stężenia w surowicy krwi na czczo oraz po podaniu mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych pomiędzy grupą zdrowych kobiet oraz tych z rakiem jelita grubego.
2. Brak zależności stężenia greliny w surowicy krwi od stopnia zaawansowania klinicznego oraz stanu patomorfologicznego raka jelita grubego może świadczyć, że hormon ten wywiera swoje działanie w wczesnym okresie karcynogenezy tego nowotworu.
3. Rozwój nowotworu jelita grubego zaburza, obserwowaną w grupie zdrowych osób, korelację stężenia greliny z wskaźnikiem masy ciała.
4. Operacyjne usunięcie nowotworu jelita grubego nie wpływa na stężenie greliny w surowicy krwi co neguje wpływ samego nowotworu na występowanie obserwowanych zmian.
5. Stwierdzone zmiany stężenia greliny mogą zostać wykorzystane do oceny stopnia ryzyka wystąpienia raka jelita grubego u kobiet.

X. STRESZCZENIE

Rak jelita grubego (RJG) jest jednym z najczęstszych nowotworów występujących w populacji ludzkiej. Wśród czynników wpływających na ryzyko zachorowania na RJG można wymienić czynniki epidemiologiczne, jelitowe oraz dietetyczne. Nadal jednak trwają poszukiwania czynników, które połączyłyby te wszystkie ogniwa w logiczną całość. Jednym z takich czynników mógłby być odkryty w 1999 roku 28-aminokwasowy hormon nazwany greliną. Funkcja tego peptydu w organizmie jest nadal przedmiotem intensywnych badań. Jego szeroka dystrybucja wskazywać może na wielokierunkowe działanie. Dotychczas opublikowane w literaturze badania przemawiają za możliwym pośrednim lub bezpośrednim udziałem greliny w procesach karcynogenezy raka jelita grubego i innych nowotworów. Nie prowadzono jednak dotychczas szczegółowych badań dotyczących stężenia i/lub zmian stężenia greliny w surowicy krwi u ludzi z RJG.

Hipoteza badawcza: Na podstawie opublikowanych wyników badań można przypuszczać, że grelina może być pierwotnym lub wtórnym czynnikiem ryzyka rozwoju raka jelita grubego, a jej stężenie i/lub zmiany stężenia w surowicy krwi różnią się pomiędzy grupą osób zdrowych oraz z rakiem jelita grubego.

Cel: Celem podjętego badania była ocena przydatności oznaczenia stężenia greliny w surowicy krwi u chorych z rakiem jelita grubego poprzez porównanie stężenia greliny w grupie kobiet i mężczyzn: na czczo u pacjentów z RJG i osób zdrowych, po podaniu mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych oraz przed i po zabiegu operacyjnym. Porównywano również stężenie greliny w grupach podzielonych ze względu na lokalizację RJG, jego zaawansowanie kliniczne, zróżnicowanie komórek, brak lub obecność komórek raka śluzowotwórczego. Ponadto, oceniano korelację stężenia greliny z wybranymi parametrami oceniającymi stan odżywienia, stężeniem antygenu karcynoembrionalnego (CEA) oraz leptyny w surowicy krwi pacjentów z RJG.

Materiał i metodyka: Do badań włączono 47 pacjentów z RJG (23 mężczyzn i 22 kobiet) oraz 37 zdrowych osób stanowiących grupę kontrolną. Średni wiek pacjentów z RJG wyniósł 68,1 (36-85) lat, a osób zdrowych 40,4 (22-67) lat. Wśród spełniających kryteria włączenia oraz wyłączenia osób z RJG pełny protokół badania przeprowadzono u 31 chorych.

U 16 pacjentów z powodu przyczyn techniczno-metodologicznych wykonano oznaczenie stężenia greliny na czczo przed- oraz w 7. dobie po zabiegu operacyjnym.

Pełny protokół badania obejmował oznaczenie przedoperacyjnego stężenia greliny na czczo w surowicy krwi, a następnie 60 oraz 120 min po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Dodatkowo oznaczano przedoperacyjne stężenie leptyny oraz stężenie greliny na czczo w surowicy krwi w 7. dobie po zabiegu operacyjnym. U wszystkich pacjentów dokonywano oceny wybranych parametrów stanu odżywienia, lokalizacji, stopnia zaawansowania i zróżnicowania RJG oraz poziomu przedoperacyjnego CEA. Do pomiaru poziomu greliny i leptyny wykorzystywano dostępne komercyjnie zestawy RIA.

Wśród pacjentów z RJG dominowała lokalizacja guza w odbytnicy - 40,4% przypadków. 23,4% raków lokalizowało się w esicy, w kątnicy 17%, zstępnicy 10,6%, wstępnicy 8,5% oraz w poprzecznicy 2,1%. Wszyscy chorzy badanej grupy byli operowani. U 3 pacjentów (6,4%) wykonano wycięcie miejscowe w technice TEM (Transanal Endoscopic Microsurgery), u 12 pacjentów (25,5%) hemikolektomię prawostronną, u 6 pacjentów (12,8%) hemikolektomię lewostronną, u 8 pacjentów (17,0%) sigmoidektomię, u 13 pacjentów (27,6%) niską przednią i międzyzwieraczkową resekcję odbytnicy, kolektomię u 3 pacjentów (6,4%). U wszystkich ww. pacjentów zabieg był radykalny makroskopowo i mikroskopowo. We wszystkich przypadkach w pooperacyjnym badaniu histopatologicznym potwierdzono utkanie raka gruczołowego. Przeważały przypadki pT4 stanowiące 61,7% materiału, pT3 stanowiły 10,6%, pT2 17,1% oraz pT1 10,6%. U 26 pacjentów (55,3%) nie stwierdzono przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych (pN0). U 10 (21,3%) stwierdzono przerzuty w 1-3 węzłach chłonnych (pN1). Z kolei u 11 osób (23,4%) stwierdzono powyżej 3 węzłów zmienionych przerzutowo (pN2). Histopatologiczna ocena stopnia zróżnicowania RJG wykazała przewagą raka o średnim stopniu zróżnicowania (G2) - 63,8% przypadków. Raki o wysokim stopniu zróżnicowania (G1) stanowiły 21,3%, natomiast o niskim stopniu zróżnicowania (G3) stanowiły 14,9% przypadków. Komórki raka gruczołowego śluzotwórczego wystąpiły w 40,4% przypadków.

Wyniki: Wykazano, podobnie jak w dotychczas opublikowanych badaniach, statystycznie istotny spadek średniego stężenia greliny zarówno 60 oraz 120 min po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie kontrolnej kobiet jak i mężczyzn (odpowiednio $p=0,001$ i $p=0,01$ oraz $p<0,001$ i $p<0,001$). Świadczy to o prawidłowym doborze grupy kontrolnej i poprawności protokołu badań. W przeciwieństwie

do grupy kontrolnej oraz grupy mężczyzn z RJG, w **grupie kobiet z RJG nie stwierdzono statystycznie istotnego spadku średniego stężenia greliny** zarówno po 60 min, jak i 120 min po doustnym podaniu 100ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych ($p=0,08$). Wykazano ponadto, że w grupie kobiet z RJG **występował statystycznie istotny wzrost stężenia greliny na czczo po zabiegu operacyjnym** ($p=0,01$), czego nie stwierdzono w grupie mężczyzn z tym nowotworem ($p=0,2$). Wykazano również **statystycznie istotnie wyższe stężenie greliny na czczo w grupie zdrowych kobiet w porównaniu do grupy kobiet z RJG** ($p=0,048$). Z kolei w grupie zdrowych mężczyzn stężenie greliny na czczo było niższe w porównaniu do grupy pacjentów z RJG, ale różnica ta była statystycznie nieistotna.

Porównano również pacjentów ze względu na płeć oraz wskaźnik masy ciała (BMI) zgodnie z wytycznymi WHO. Zgodnie z oczekiwaniami **średnie stężenie greliny zarówno na czczo jak i po podaniu mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych było niższe w grupie pacjentów z nadwagą/otyłością** ($BMI > 25 \text{ kg/m}^2$) w porównaniu do grupy pacjentów z prawidłową masą ciała ($BMI 18,5-24,9 \text{ kg/m}^2$), ale różnice w stężeniu greliny pomiędzy tymi grupami w danym punkcie czasu były statystycznie nieistotne. W grupie mężczyzn z RJG o prawidłowej masie ciała obserwowano statystycznie istotny spadek poziomu greliny po 120 min po doustnym podaniu 100ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych ($p=0,04$). W grupie mężczyzn z nadwagą/otyłością, z powodu małej wielkości grupy, nie obserwowano statystycznie istotnego spadku po tym czasie ($p=0,27$). Z kolei w grupie kobiet z RJG z prawidłową masą ciała oraz nadwagą/otyłością nie stwierdzono statystycznie istotnego spadku stężenia greliny w surowicy po 60 min i 120 min po doustnym podaniu 100ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych ($p=0,85$).

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic porównując stężenie greliny wśród pacjentów podzielonych na grupy ze względu na lokalizację guza. Dokonując takiego porównania z podziałem na płeć, stwierdzono statystycznie znamienne mniejsze stężenie greliny w grupie kobiet w stosunku do mężczyzn z RJG zlokalizowanym w okrężnicy. **Ponadto, nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy stężenia greliny w zależności od głębokości naciekania RJG pT** ($p=0,53$), **stopnia zajęcia węzłów chłonnych pN** ($p=0,95$), braku lub obecności komórek raka śluzowotwórczego ($p=0,6$), **zróznicowania komórek RJG** ($p=0,36$), stopnia zaawansowania kliniczno-patologicznego ($p=0,98$), stopnia zaawansowania wg klasyfikacji Dukesa w modyfikacji Astlera i Collera ($p=0,96$) oraz typu wykonanej operacji ($p=0,33$). Nie stwierdzono również korelacji stężenia greliny z wiekiem, wagą (w przeciwieństwie do grupy kontrolnej), wzrostem, całkowitą liczbą limfocytów we

krwi, stężeniem albumin, białka, leptyny oraz antygenu karcynoembrionalnego w surowicy krwi.

W analizie krzywej ROC **w grupie kobiet stwierdzono, że wartość stężenia greliny na czczo w surowicy krwi może posłużyć do oceny ryzyka choroby** przy punkcie odcięcia wynoszącym $\leq 18,43$ pg/ml (czułość 37,5%, swoistość 95,2% przy wskaźniku wiarygodności 7,87). Z kolei analiza krzywej ROC dla zmian stężenia greliny po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych **wykazała przydatność tego oznaczenia do oceny ryzyka wystąpienia raka jelita grubego w grupie kobiet** przy punkcie odcięcia wynoszącym $\leq 1,68$ (czułość 86,7%, swoistość 85,71% przy wskaźniku wiarygodności 6,1).

Wnioski: Grelina może być jednym z pierwotnych czynników ryzyka rozwoju raka jelita grubego u kobiet ponieważ stwierdzono różnicę jej stężenia na czczo i po podaniu mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych pomiędzy grupą zdrowych kobiet oraz tych z RJG. Brak zależności stężenia greliny w surowicy krwi od stopnia zaawansowania klinicznego oraz stanu patomorfologicznego raka jelita grubego może świadczyć, że hormon ten wywiera swoje działanie w wczesnym okresie karcynogenezy tego nowotworu. Ponadto, rozwój nowotworu jelita grubego zaburza, obserwowaną w grupie zdrowych osób, korelację stężenia greliny z wskaźnikiem masy ciała. Wykazano, że operacyjne usunięcie raka jelita grubego nie wpływa na stężenie greliny w surowicy krwi co neguje wpływ samego nowotworu na występowanie obserwowanych zmian. Stwierdzone zmiany stężenia greliny mogą jednak zostać wykorzystane do oceny stopnia ryzyka raka jelita grubego u kobiet.

XI. ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common tumors in human population. Several risk factors such as epidemiological, intestinal and diet have been identified. Researchers still look for factors that would be able to join these elements in a logical way. One of such integrating factors could be 28-amino acid hormone, discovered in 1999, named “ghrelin”. At present, function of ghrelin is a subject of intensive research. Its wide distribution in the human body indicate a wide spectrum of application. Published results show a possible direct or indirect role of ghrelin in the carcinogenesis of the colorectal and other cancers. However, ghrelin level and/or changes in ghrelin level in CRC patients have not been studied in detail until now.

Research hypothesis: Based on published results it is possible that ghrelin could be primary or secondary risk factor of developing colorectal cancer and its level and/or changes in level in blood differ between healthy individuals and patients with colorectal cancer.

Aim: The aim of this research was to determine usefulness of ghrelin measure in blood plasma in patients with colorectal cancer through comparison of ghrelin level in male and female group: in fasting state in patients with CRC and healthy group, after ingestion of long chain triglycerides and before and after operation. Plasma ghrelin level was also compared between subgroups divided in respect of location of CRC, its staging, grading presence or absence of mucinous adenocarcinoma cells. Furthermore, correlation between plasma ghrelin level and selected parameters of nutritional status, carcinoembryonic antigen (CEA) and plasma leptin level were examined in group of patients with colorectal cancer.

Material and Methods: 47 patients with CRC (23 male and 22 female; ranging in age from 36 to 85 years with a mean of 68.1 years) treated in the Department of General Surgery and 37 healthy individuals (16 male and 21 female; ranging in age from 22 to 67 years with a mean age of 40.4 years) were included in the study. From patients fulfilling the inclusion and exclusion criteria, the full protocol was carried out in 31 patients. In 16 patients ghrelin level was measured before and on the 7. postoperative day due to technical and methodological problems.

The full protocol of the study consisted of preoperative collection of ghrelin fasting blood sample, ingestion of 100 ml long chain triglycerides and blood sampling performed every 60min for 2 hours postprandially. Additionally, a fasting blood sample was collected on the 7. day postoperatively. Selected parameters, including body mass index, nutritional status, location of tumor, grading, staging, preoperative CEA and leptin level were analyzed in this study. Total ghrelin and leptin level in plasma were analyzed using commercially available RIA.

Forty percent, 23%, 17%, 10%, 8% and 2% of the subjects were affected, respectively, by carcinomas of the rectum, sigmoideum, caecum, colon descendens, colon ascendens and transversum. All the patients were operated on. Three (6.4%), 12 (25.5%), 6 (12.8%), 8 (17%) and 13 (27.6%) of the subjects had, respectively, local excision using TEM (Transanal Endoscopic Microsurgery), right hemicolectomy, left hemicolectomy, sigmoidectomy, low anterior and intersphincteric rectum resection. All these patients had a macro- and microscopic radical operation. Colorectal adenocarcinoma was confirmed in all cases in postoperative histopathological examination. Ten percent of the adenocarcinomas were at stage pT1 according to TNM staging system, 17% at stage pT2, 10% at stage pT3 and 61% at stage pT4. In 26 patients (55,3%) there was no regional lymph nodes invasion detected (pN0). In 10 subjects (21,3%) there was between 1 and 3 positive lymph nodes (pN1) and in 11 (23,4%) over 3 positive lymph nodes (pN2) were detected. Sixty-three percent, 21% and 14% of the subjects were affected, respectively, by middle differentiation grade (G2), high differentiation grade (G1) and low differentiation grade (G3) carcinomas. In 40,4% of cases mucinous adenocarcinoma cells were identified.

Results: Similar to other published papers in medical literature, mean plasma ghrelin concentration decreased statistically significantly after 60 and 120 minute in the postprandial period both in male and female control group (respectively $p=0.001$ and $p=0.01$; $p<0.001$ and $p<0.001$). It proves the proper selection of the control group and correctness of the study protocol.

In contrast to the control and male CRC group there was no statistically significant decrease in ghrelin concentration among female patients ($p=0.08$). Furthermore, there was a statistically significant increase in postoperative fasting ghrelin concentration among female patients ($p=0.01$), what was not observed in CRC male group ($p=0.2$). Mean fasting plasma ghrelin concentration in healthy female control group was statistically significantly increased in comparison to CRC female group ($p=0.048$). Mean fasting plasma ghrelin concentration in

healthy male control group was lower in comparison to CRC male group, but the difference was not statistically significant.

As expected, comparison of patients based on gender and body mass index (BMI), according to WHO calculation, showed lower mean fasting and postprandial plasma ghrelin concentration among overweight and obese patients (BMI >25 kg/m²), but the differences were not statistically significant. Mean plasma ghrelin concentration fell statistically significantly after 120 minutes postprandially in CRC male group with normal weight (BMI 18.5-24.9 kg/m²) (p=0.04). Due to small number of subjects in CRC overweight/obese male group no statistically significant decrease of postprandial mean plasma ghrelin concentration was noticed (p=0.27). Among CRC female group with normal weight and overweight/obese group there was no statistically significantly decrease in postprandial mean plasma ghrelin concentration (p=0.85).

There were no differences in mean fasting plasma ghrelin concentration between subgroups divided based on location of CRC. Making comparison in terms of gender, statistically significantly lower level of plasma ghrelin among CRC female group than in male CRC group in colon was observed. Furthermore, there was no statistically significantly difference in mean fasting plasma ghrelin concentration in subgroups divided in respect of invasion grade pT (p=0.53), presence of lymph nodes metastasis pN (p=0.95), differentiation grade (p=0.36), Dukes, Astler-Coller staging (p=0.96), presence of mucinous adenocarcinoma cells (p=0.6) and type of performed operation (p=0.33). Age, weight (in contrast to the healthy control group), height, total lymphocyte count, plasma albumin and protein concentration and preoperative CEA level was found to be not correlated with the fasting ghrelin concentrations.

ROC curve analysis showed that fasting plasma ghrelin concentration can be useful in risk assessment of colorectal cancer disease with cut-off point ≤ 18.43 pg/ml (sensitivity 37.5%, specificity 95.2%; likelihood ratio 7.87) in female group. ROC curve analysis showed that changes in postprandial plasma ghrelin concentration can be useful in risk assessment of colorectal cancer disease with cut-off point ≤ 1.68 pg/ml (sensitivity 86.7%, specificity 85.7%; likelihood ratio 6.1) in female group.

Conclusion: Ghrelin could be one of the primary risk factors of developing colorectal cancer in female because of the confirmation statistically significant difference in fasting and postprandial plasma ghrelin level between healthy control and CRC female group. The lack of difference in plasma ghrelin concentration between various stages and cell differentiation

grade of CRC suggests that ghrelin exerts its activity in the early period of CRC carcinogenesis. Furthermore, the progression of the disease disturbs the correlation between BMI and plasma ghrelin level, which was observed in healthy control group. Radical resection of the CRC has no influence on plasma ghrelin level what, in turn, negates influence of the tumor alone on observed changes. However, identified changes in plasma ghrelin concentration among female with CRC may be used to assess risk of developing CRC in this group of patients.

XII. SPIS ILUSTRACJI

Rysunek 1. Drogi stymulacji wydzielania hormonu wzrostu.....	5
Rysunek 2. Struktura 28-aminokwasowej ludzkiej greliny. W pozycji 3 występuje oktaacetylowana seryna.....	7
Rysunek 3. Schemat przedstawiający powstawanie aktywnej formy greliny.....	10
Rysunek 4. Rodzina receptorów związanych z białkiem G (GPCR).....	14
Rysunek 5. A) Receptor GHSR-1a, B) Receptor GHSR-1b.....	15
Rysunek 6. Zmiany stężenia greliny w surowicy krwi w ciągu dnia.....	17
Rysunek 7. Zmiany stężenia greliny w surowicy krwi w zależności od posiłku.....	19
Rysunek 8. Stany kliniczne związane ze zmianami w poziomie greliny u ludzi.....	21
Rysunek 9. Schemat ideowy podwójnej drogi działania greliny na podwzgórze.....	23
Rysunek 10. Schemat przedstawiający regulację apetytu przez grelinę.....	24
Rysunek 11. Hipotetyczny model wzajemnego oddziaływania układu endokrynnego i immunologicznego zaproponowany przez Dixit'a.....	28
Rysunek 12. Czynniki ryzyka wspólne dla rozwoju insulinooporności oraz raka jelita grubego.....	38
Rysunek 13. Hipotetyczny model karcynogenezy RJG u myszy pozbawionych genu gastryny.....	41
Rysunek 14. Potencjalny mechanizm działania systemowej/lokalnej greliny na komórki raka prostaty/piersi.....	42
Rysunek 15. Graficzna prezentacja czasu pobrania krwi oraz podania emulsji długołańcuchowych kwasów tłuszczowych.....	51
Rysunek 16. Wykres przedstawiający średnie stężenie greliny (oraz 95% przedział ufności) na czczo oraz 60 i 120 min po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie zdrowych mężczyzn i kobiet.....	55
Rysunek 17. Wykres radarowy przedstawiający zmiany stężenia greliny na czczo (warstwa niebieska) oraz 60 (warstwa czerwona) i 120 min (warstwa zielona) po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych poszczególnych osob w grupie kontrolnej mężczyzn i kobiet.....	56
Rysunek 18. Korelacja stężenia greliny na czczo z wiekiem wyrażonym w latach.....	57
Rysunek 19. Korelacja stężenia greliny na czczo z wagą wyrażoną w kilogramach.....	58
Rysunek 20. Korelacja stężenia greliny na czczo z wzrostem wyrażonym w metrach.....	58
Rysunek 21. Korelacja stężenia greliny na czczo z % zawartością tkanki tłuszczowej.....	59
Rysunek 22. Wykres przedstawiający średnie stężenie greliny (oraz 95% przedział ufności) na czczo oraz 60 i 120 min po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie mężczyzn i kobiet z RJG.....	60
Rysunek 23. Wykres radarowy przedstawiający zmiany stężenia greliny na czczo (warstwa niebieska) oraz 60 (warstwa czerwona) i 120 min (warstwa zielona) po podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie mężczyzn i kobiet z RJG.....	61
Rysunek 24. Wykres przedstawiający stężenie greliny na czczo przed oraz 7 dni po zabiegu operacyjnym w grupie mężczyzn z RJG.....	62
Rysunek 25. Wykres przedstawiający stężenie greliny na czczo przed oraz 7 dni po zabiegu operacyjnym w grupie kobiet z RJG.....	62
Rysunek 26. Wykres przedstawiający stężenia greliny (oraz 95% przedział ufności) na czczo, przed podaniem 100 ml długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, oraz 60 i 120 min po spożyciu ww. posiłku w grupie zdrowych mężczyzn oraz z rakiem jelita grubego.....	63
Rysunek 27. Wykres zmian średniego stężenia greliny (oraz 95% przedział ufności) na czczo oraz 60 i 120 min po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie zdrowych kobiet oraz z rakiem jelita grubego.....	64

Rysunek 28. Wykres zmian średniego stężenia greliny (oraz 95% przedział ufności) na czczo oraz 60 i 120 min po doustnym podaniu 100 ml długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w grupie pacjentów masą ciała (BMI 18,5-24,9 kg/m ²) oraz w grupie z nadwagą/otyłością (BMI >25 kg/m ²).....	65
Rysunek 29. Wykres zmian średniego stężenia greliny (oraz 95% przedział ufności) na czczo oraz 60 i 120 min po podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych spożyciu w grupie kobiet i mężczyzn z prawidłową masą ciała (BMI 18,5-24,9 kg/m ²) oraz w grupie z nadwagą/otyłością (BMI >25 kg/m ²).....	67
Rysunek 30. Średnie stężenie greliny na czczo ± odchylenie standardowe u pacjentów z guzem w danej lokalizacji.....	68
Rysunek 31. Średnie stężenie greliny ± odchylenie standardowe u pacjentów z guzem w danej lokalizacji.....	68
Rysunek 32. Wykres przedstawiający średnie stężenie greliny oraz 95% przedział ufności porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z daną lokalizacją guza.....	69
Rysunek 33. Średnie stężenie greliny ± odchylenie standardowe u pacjentów danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego pT.....	70
Rysunek 34. Wykres ramka wąsy przedstawiający średnie stężenie greliny oraz 95% przedział ufności porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego.....	71
Rysunek 35. Średnie stężenie greliny ± odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zajęcia węzłów chłonnych.....	72
Rysunek 36. Wykres ramka wąsy przedstawiający średnie stężenie greliny oraz 95% przedział ufności porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zajęcia regionalnych węzłów chłonnych (pN).....	73
Rysunek 37. Średnie stężenie greliny na czczo ± odchylenie standardowe u pacjentów z rakiem śluzowotwórczym jelita grubego lub bez.....	74
Rysunek 38. Wykres ramka wąsy przedstawiający średnie stężenie greliny oraz 95% przedział ufności porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z obecnością lub brakiem komórek raka śluzowotwórczego.....	75
Rysunek 39. Średnie stężenie greliny na czczo ± odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zróżnicowania komórek RJG.....	76
Rysunek 40. Wykres ramka wąsy przedstawiający średnie stężenie greliny oraz 95% przedział ufności porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z stopniem zróżnicowania komórek RJG (G).....	77
Rysunek 41. Średnie stężenie greliny ± odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego.....	78
Rysunek 42. Wykres ramka wąsy przedstawiający średnie stężenie greliny oraz 95% przedział ufności porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zaawansowania kliniczno-morfologicznego.....	79
Rysunek 43. Średnie stężenie greliny ± odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania RJG wg klasyfikacji Dukesa w modyfikacji Astlra i Collera.....	80
Rysunek 44. Wykres ramka wąsy przedstawiający średnie stężenie greliny oraz 95% przedział ufności porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zaawansowania wg klasyfikacji Dukesa w modyfikacji Astlra-Collera.....	81
Rysunek 45. Średnie stężenie greliny w 7 dni po zabiegu operacyjnym ± odchylenie standardowe u pacjentów poddanych danemu zabiegowi operacyjnemu.....	82
Rysunek 46. Średnie stężenie greliny przed oraz w 7 dni po zabiegu operacyjnym ± odchylenie standardowe u pacjentów poddanych danemu zabiegowi operacyjnemu.....	83
Rysunek 47. Wykres rozrzutu grelina a wiek wyrażony w latach.....	84
Rysunek 48. Wykres rozrzutu grelina a masa ciała wyrażona w kilogramach.....	84

Rysunek 49. rozrzutu stężenie greliny na czczo a wzrost wyrażony w metrach.....	85
Rysunek 50. Wykres rozrzutu grelina a całkowita liczba limfocytów wyrażona w tys/ml	85
Rysunek 51. Wykres rozrzutu grelina a % zawartość tkanki tłuszczowej	86
Rysunek 52. Wykres rozrzutu grelina a stężenie leptyny na czczo.....	86
Rysunek 53. Wykres rozrzutu grelina a stężenie białka we krwi.....	87
Rysunek 54. Wykres rozrzutu grelina a stężenie albuminy (g/l) we krwi	87
Rysunek 55. Wykres rozrzutu grelina a stężenie CEA we krwi	88
Rysunek 56. Krzywa ROC w grupie kobiet. Zaznaczono punkt odcięcia wynoszący dla stężenia greliny w surowicy krwi $\leq 18,43$ pg/ml uzyskując czułość testu na poziomie 37,5% oraz jego swoistość 95,2%	89
Rysunek 57. Krzywa ROC w grupie kobiet. Zaznaczono punkt odcięcia dla różnicy stężenia greliny w surowicy krwi po 120 min od podania mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych wynoszącej $\leq 1,68$. % uzyskując czułość takiego testu na poziomie 86,7% oraz jego swoistość 85,71% przy wskaźniku wiarygodności 6,1.	90
Rysunek 58. Wykres rozrzutu stężenia greliny na czczo oraz masy ciała wyrażonej w kilogramach w grupie kontrolnej oraz chorych na RJG.....	98

XIII. SPIS TABEL

Tabela 1. Sekwencja aminokwasowa greliny wśród różnych gatunków ssaków. Dla porównania przedstawiono również sekwencję aminokwasową ludzkiej greliny	7
Tabela 2. Zestawienie dotychczas opublikowanych badań dotyczących aktywności biologicznej desacylowanej greliny	9
Tabela 3. Podsumowanie udowodnionych dotychczas funkcji greliny u ludzi	32
Tabela 4. Cechy populacyjne, mikroskopowe i kliniczne 47 chorych z RJG	48
Tabela 5. Cechy populacyjne, mikroskopowe i kliniczne 31 osób grupy kontrolnej	49
Tabela 6. Zaawansowanie guza (pT) oraz stan mikroskopowy regionalnych węzłów chłonnych (pN) w grupie 47 chorych na RJG.....	49
Tabela 7. Skład emulsji Colagen oraz profil długołańcuchowych kwasów tłuszczowych.	52
Tabela 8. Typ wykonanej operacji w grupie 47 chorych na RJG	53
Tabela 9. Średnie stężenie greliny na czczo oraz po doustnym podaniu mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych ± odchylenie standardowe [pg/ml] w grupie zdrowych kobiet i mężczyzn.	55
Tabela 10. Procentowy udział podgrup składających się z osób u których stężenie greliny wzrosło, spadło lub nie zmieniło się po 60 i 120 min po doustnym przyjęciu mieszaniny kwasów tłuszczowych w stosunku do stężenia wyjściowego (na czczo) zarówno w grupie zdrowych kobiet i mężczyzn.	56
Tabela 11. Analiza korelacji stężenia greliny na czczo z wybranymi parametrami stanu odżywienia.	57
Tabela 12. Średnie stężenie greliny na czczo oraz po doustnym posiłku ± odchylenie standardowe [pg/ml] w grupie kobiet i mężczyzn z RJG.....	59
Tabela 13. Procentowy udział podgrup składających się z osób u których stężenie greliny wzrosło, spadło lub nie zmieniło się po 60 i 120 min po doustnym przyjęciu mieszaniny kwasów tłuszczowych w stosunku do stężenia wyjściowego (na czczo) zarówno w grupie kobiet i mężczyzn z RJG.	61
Tabela 14. Stężenie greliny na czczo ± odchylenie standardowe przed oraz 7 dni po zabiegu operacyjnym.....	61
Tabela 15. Stężenie greliny na czczo oraz po doustnym posiłku ± odchylenie standardowe [pg/ml] w grupie zdrowych kobiet i mężczyzn.....	63
Tabela 16. Stężenie greliny na czczo oraz po doustnym posiłku ± odchylenie standardowe [pg/ml] w grupie zdrowych kobiet oraz z RJG	64
Tabela 17. Stężenie greliny na czczo oraz po doustnym posiłku ± odchylenie standardowe [pg/ml] w grupie pacjentów z prawidłową masą ciała oraz w grupie z nadwagą/otyłością. ...	65
Tabela 18. Średnie stężenie greliny na czczo oraz 60 i 120 min po doustnym podaniu 100 ml mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych ± odchylenie standardowe [pg/ml] w grupie pacjentów z prawidłową masą ciała (BMI 18,5-24,9 kg/m ²) oraz w grupie z nadwagą/otyłością (BMI >25 kg/m ²).....	66
Tabela 19. Średnie stężenie greliny na czczo ± odchylenie standardowe u pacjentów z guzem w danej lokalizacji.....	67
Tabela 20. Średnie stężenie greliny ± odchylenie standardowe porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z daną lokalizacją guza.....	69
Tabela 21. Średnie stężenie greliny ± odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego	70
Tabela 22. Średnie stężenie greliny ± odchylenie standardowe porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego (pT)...	71
Tabela 23. Średnie stężenie greliny na czczo ± odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego pN.....	72

Tabela 24. Średnie stężenie greliny ± odchylenie standardowe porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zajęcia regionalnych węzłów chłonnych (pN)	72
Tabela 25. Średnie stężenie greliny na czczo ± odchylenie standardowe u pacjentów z rakiem śluzowotwórczym jelita grubego lub bez	73
Tabela 26. Średnie stężenie greliny ± odchylenie standardowe porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z z obecnością lub brakiem komórek raka śluzowotwórczego	74
Tabela 27. Średnie stężenie greliny na czczo ± odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zróżnicowania komórek RJG.....	75
Tabela 28. Średnie stężenie greliny ± odchylenie standardowe porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zróżnicowania komórek RJG (G)	76
Tabela 29. Średnie stężenie greliny ± odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania kliniczno-patomorfologicznego	77
Tabela 30. Średnie stężenie greliny ± odchylenie standardowe porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z stopniem zaawansowania kliniczno-morfologicznego	78
Tabela 31. Średnie stężenie greliny ± odchylenie standardowe u pacjentów z danym stopniem zaawansowania RJG wg klasyfikacji Dukesa w modyfikacji Astlra i Collera.	79
Tabela 32. Średnie stężenie greliny ± odchylenie standardowe porównujący grupę kobiet i mężczyzn z RJG z danym stopniem zaawansowania wg klasyfikacji Dukesa w modyfikacji Astlra-Collera	80
Tabela 33. Średnie stężenie greliny przed oraz w 7 dni po zabiegu operacyjnym ± odchylenie standardowe u pacjentów poddanych danemu zabiegowi operacyjnemu.....	82
Tabela 34. Analiza korelacji stężenia greliny na czczo z innymi parametrami w grupie pacjentów z RJG.....	83
Tabela 35. Analiza krzywej ROC w grupie kobiet dla stężenie greliny na czczo [pg/ml] oraz różnicy stężenia greliny w surowicy krwi po 120 min od podania mieszaniny długołańcuchowych kwasów tłuszczowych.....	89
Tabela 36. Zestawienie prac badających zmiany stężenia greliny po podaniu różnego rodzaju posiłków.	93

XIV. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Bowers CY, Momany F, Reynolds GA i wsp. Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology* 1980; 106: 663–667
- ² Deghenghi R. The development of “impervious peptides” as growth hormone secretagogues. *Acta Paediatr Suppl* 1997; 423: 85–87
- ³ Bowers CY, Momany FA, Reynolds GA i wsp. On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology* 1984; 114: 1537–1545
- ⁴ Cheng K, Chan WW, Butler B i wsp. Stimulation of growth hormone release from rat primary pituitary cells by L-692,429, a novel nonpeptidyl GH secretagogue. *Endocrinology* 1993; 132: 2729–2731
- ⁵ Smith RG, Cheng K, Schoen WR i wsp. A nonpeptidyl growth hormone secretagogue. *Science* 1993; 260: 1640–1643
- ⁶ Akman MS, Girard M, O’Brien LF i wsp. Mechanisms of action of a second generation growth hormone-releasing peptide (Ala-His-D-beta Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) in rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 1993; 132: 1286–1291
- ⁷ Blake AD and Smith RG. Desensitization studies using perfused rat pituitary cells show that growth hormone-releasing hormone and His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ stimulate growth hormone release through distinct receptor sites. *J Endocrinol* 1991; 129: 11–19
- ⁸ Cheng K, Chan WW, Barreto A Jr i wsp. The synergistic effects of His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ on growth hormone (GH)-releasing factor-stimulated GH release and intracellular adenosine 3,5-monophosphate accumulation in rat primary pituitary cell culture. *Endocrinology* 1989; 124: 2791–2798
- ⁹ Cheng K, Chan WW, Butler B i wsp. Evidence for a role of protein kinase-C in His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂-induced growth hormone release from rat primary pituitary cells. *Endocrinology* 1991; 129: 3337–3342
- ¹⁰ Popovic V, Micic D, Damjanovic S i wsp. Evaluation of pituitary GH reserve with GHRP-6. *J Pediatr Endocrinol Metab* 9 Supp 1996; 3: 289–298
- ¹¹ Howard AD, Feighner SD, Cully DF i wsp. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996; 273: 974–977
- ¹² Meunier JC, Mollereau C, Toll L i wsp. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 1995; 377: 532–535

-
- ¹³ Sakurai T, Amemiya A, Ishii M *i* wsp. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92: 573–585
- ¹⁴ Hinuma S, Habata Y, Fujii R *i* wsp. A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 1998; 393: 272–276
- ¹⁵ Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y *i* wsp. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 471–476
- ¹⁶ Fujii R, Yoshida H, Fukusumi S *i* wsp. Identification of a neuropeptide modified with bromine as an endogenous ligand for GPR7. *J Biol Chem* 2002; 277: 34010–34016
- ¹⁷ Bennett PA, Thomas GB, Howard AD *i* wsp. Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat. *Endocrinology* 1997; 138: 4552–4557
- ¹⁸ Bennett PA, Thomas GB, Howard AD *i* wsp. Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat. *Endocrinology* 1997; 138: 4552–4557
- ¹⁹ Kojima M, Hosoda H, Date Y *i* wsp. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656–660
- ²⁰ Tomasetto C, Karam SM, Ribieras S *i* wsp. Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone: the motilin-related peptide. *Gastroenterology* 2000; 119: 395-405
- ²¹ Sheppard P, Deisher T. Motilin Homologes. Patent Application WO 98/42840
- ²² Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 2005; 85: 495-522
- ²³ Banks WA, Tschop M, Robinson SM *i* wsp. Extent and direction of ghrelin transport across the bloodbrain barrier is determined by its unique primary structure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002; 302: 822-827
- ²⁴ Hosoda H, Kojima M, Mizushima T *i* wsp. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by posttranslational processing. *J Biol Chem* 2003; 278: 64–70
- ²⁵ Lucidi P, Murdolo G, Di Loretto C *i* wsp. Meal intake similarly reduces circulating concentrations of octanoyl and total ghrelin in humans. *J Clin Invest* 2004; 27: 12-15
- ²⁶ Hosoda H, Kojima M, Matsuo H *i* wsp. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 279: 909-913

-
- ²⁷ Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS i wsp. Structure-function studies on the new growth hormonereleasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem* 2000; 43: 4370–4376
- ²⁸ Matsumoto M, Hosoda H, Kitajima Y i wsp. Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 142–146
- ²⁹ Matsumoto M, Kitajima Y, Iwanami T i wsp. Structural similarity of ghrelin derivatives to peptidyl growth hormone secretagogues. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284: 655–659
- ³⁰ Folwaczny C, Chang JK, Tschop M. Ghrelin and motilin: two sides of one coin? *European Journal of Endocrinology* 2001; 144: 1-3
- ³¹ Hosoda H, Kojima M, Matsuo H i wsp. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 909–913
- ³² De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R i wsp. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology* 2004; 145: 4997-5005
- ³³ Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S i wsp. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 2002; 159: 1029–1037
- ³⁴ Cassoni P, Ghe C, Marrocco T i wsp. Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 173–184
- ³⁵ Ghigo E, Broglio F, Arvat E i wsp. Ghrelin: more than a natural GH secretagogue and/or an orexigenic factor. *Clin Endocrinol* 2005; 62(1): 1-17
- ³⁶ Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD i wsp. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 1997; 18: 621–645
- ³⁷ Tanaka M, Hayashida Y, Iguchi T i wsp. Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. *Endocrinology* 2001; 142: 3697–3700
- ³⁸ Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T i wsp. Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology* 2004; 145(9): 4144 - 4153
- ³⁹ Nakai N, Kaneko M, Nakao N i wsp. Identification of promoter region of ghrelin gene in human medullary thyroid carcinoma cell line. *Life Sci* 2004; 75: 2193–2201
- ⁴⁰ Ahmed S and Harvey S. Ghrelin: a hypothalamic GH-releasing factor in domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J Endocrinol* 2002; 172: 117–125

-
- ⁴¹ Date Y, Kojima M, Hosoda H i wsp. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000; 141: 4255–4261
- ⁴² Tomasetto C, Wendling C, Rio MC i wsp. Identification of cDNA encoding motilin related peptide/ghrelin precursor from dog fundus. *Peptides* 2001; 22: 2055–2059
- ⁴³ Yabuki A, Ojima T, Kojima M i wsp. Characterization and species differences in gastric ghrelin cells from mice, rats and hamsters. *J Anat* 2004; 205: 239–246
- ⁴⁴ Tanaka-Shintani M, Watanabe M. Distributon of ghrelin-immunoreactive cells in human gastric mucosa: comparison with that of partial cells. *J Gastroenterol* 2005; 40: 345-349
- ⁴⁵ Rindi G, Necchi V, Savio A i wsp. Characterisation of gastric ghrelin cells in man and other mammals: studies in adult and fetal tissues. *Histochem Cell Biol* 2002; 117: 511–519
- ⁴⁶ Hayashida T, Nakahara K, Mondal MS i wsp. Ghrelin in neonatal ras: distribution in stomach and its possible role. *J Endocrinol* 2002; 173: 239–245
- ⁴⁷ Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M i wsp. Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 2002; 23: 531–536
- ⁴⁸ Lu S, Guan JL, Wang QP i wsp. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 2002; 321: 157–160
- ⁴⁹ Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L i wsp. Ghrelin cells replace insulin-producing beta-cells in two mouse models of pancreas developmant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2924-2929
- ⁵⁰ Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L i wsp. Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2924–2929
- ⁵¹ Wierup N, Yang S, McEvelly RJ i wsp. Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 301–310
- ⁵² Wierup N, Sundler F. Ultrastructure of islet ghrelin cells in the human fetus. *Cell Tissue Res* 2005;319:423–8
- ⁵³ Dezaki K, Hosoda H, Kakei M i wsp. Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca²⁺ signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes* 2004; 53: 3142–3151

-
- ⁵⁴ Heller RS, Jenny M, Collombat P i wsp. Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development. *Dev Biol* 2005; 286: 217–224
- ⁵⁵ Yoshimoto A, Mori K, Sugawara A i wsp. Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2748–2752
- ⁵⁶ Barreiro ML, Gaytan F, Caminos JE i wsp. Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biol Reprod* 2002; 67: 1768–1776
- ⁵⁷ Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC I wsp. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 2002; 143: 717–725
- ⁵⁸ Feighner SD, Tan CP, McKee KK i wsp. Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system. *Science* 1999; 284: 2184–2188
- ⁵⁹ Inui A. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 551–560
- ⁶⁰ Smith RG, Leonard R, Bailey AR i wsp. Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands. *Endocrine* 2001; 14: 9–14
- ⁶¹ Kaji H, Tai S, Okimura Y i wsp. Cloning and characterisation of the 5' flanking region of the human growth hormone secretagogue receptor gene. *J Biol Chem* 1998; 273(51): 1-10
- ⁶² Zhang W, Zhao L, Lin TR i wsp. Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 2484–2491
- ⁶³ Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, and Chihara K. Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 5667–5674
- ⁶⁴ Smith RG, Leonard R, Bailey AR i wsp. Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands. *Endocrine* 2001; 14: 914-920
- ⁶⁵ Deghenghi R, Papotti M, Ghigo E i wsp. Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *Journal of Endocrinological Investigation* 2001; 24: 1-3
- ⁶⁶ Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA i wsp. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2988-2994
- ⁶⁷ Guan XM, Yu H, Palyha OC i wsp. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res* 1997; 48: 23–29

-
- ⁶⁸ Hattori N, Saito T, Yagyu T i wsp. GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4284–4291
- ⁶⁹ Holst B, Cygankiewicz A, Halkjar JT i wsp. High constitutive signaling of the ghrelin receptor – identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 2201-2210
- ⁷⁰ Pantel J i wsp. Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest* 2006; 116: 760-768
- ⁷¹ Tolle V, Bassant MH, Zizzari P i wsp. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* 2002; 143: 1353-1361
- ⁷² Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C i wsp. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 2004; 287: 297-304
- ⁷³ Dzaja A, Dalal MA, Himmerich H i wsp. Sleep enhances nocturnal plasma ghrelin levels in healthy subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004; 286: 963–967
- ⁷⁴ Yildiz BO, Suchard MA, Wong ML i wsp. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 10434–10439
- ⁷⁵ Drazem DL, Vahl TP, D’Alessio DA i wsp. Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology* 2006; 147: 23-30
- ⁷⁶ Callahan HS, Cummings DE, Pep MS i wsp. Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1319-1324
- ⁷⁷ Foster-Schubert KE, Weigle DS, Frayo RS i wsp. Lipids suppress human plasma ghrelin levels less effectively than carbohydrates or proteins. *Endocrine Society, New Orleans, LA.* 2004
- ⁷⁸ Tentolouris N, Kokkinos A, Tsigos C i wsp. Differential effects of high-fat and high-carbohydrate content isoenergetic meals on plasma active ghrelin concentrations in lean and obese woman. *Horm Metab Res* 2004; 36: 559-563
- ⁷⁹ Monteleone P, Bencivenga R, Longobardi N i wsp. Differential responses of circulating ghrelin to high-fat and high carbohydrate meal in healthy woman. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5510-5514

-
- ⁸⁰ Geenman Y, Golani N, Gilad i wsp. Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner. *Clin Endocrinol* 2004; 60: 382-388
- ⁸¹ Erdmann J, Lippl G, Schusdziarra V. Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regul Pept* 2003; 116: 101-107
- ⁸² Patterson M, Murphy KG, le Roux CW i wsp. Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma. *JCEM* 2005; 90(4): 2205-2211
- ⁸³ Williams DL, Cummings E, Grill HJ i wsp. Meal-related ghrelin suppression requires postgastric feedback. *Endocrinology* 2003; 144: 2765-2767
- ⁸⁴ Overduin JS, Frayo RS, Grill HJ i wsp. Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation. *Endocrinology* 2005; 146: 845-850
- ⁸⁵ Diana L, Cummings W, Cummings DE i wsp. Regulation of ghrelin in physiologic and pathophysiologic states. *J Nutr* 2005; 135: 1320-1325
- ⁸⁶ Schaller G, Schmidt A, Pleiner J. Plasma ghrelin concentrations are not regulated by glucose or insulin. *Diabetes* 2003; 52: 16-20
- ⁸⁷ Heath RB, Jones R, Frayn KN i wsp. Vagal stimulation exaggerates the inhibitory ghrelin response to oral fat in humans. *J Endocrinol* 2004; 180: 273-281
- ⁸⁸ Murdolo G, Lucidi P, Diloreto C i wsp. Insulin is required for prandial ghrelin suppression in humans. *Diabetes* 2003; 52: 2923-2927
- ⁸⁹ Goldstone AP, Thomas EL, Brynes AE i wsp. Elevated fasting plasma ghrelin in Prader Willi syndrome adults is not solely explained by their reduced visceral adiposity and insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004; 89: 1718-1726
- ⁹⁰ McLaughlin T, Abbasi f, Lamendola C i wsp. Plasma ghrelin concentrations are decreased In insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. *J clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1630-1635
- ⁹¹ Leidy HJ, Gardner JK, Frye BR i wsp. Circulating ghrelin is sensitive to changes in body weight during diet and exercise program in normal-weight young woman. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2659-2664
- ⁹² Robertson MD, Henderson RA, Vist GE i wsp. Plasma ghrelin response following a period of acute overfeeding in normal weight men. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004; 28: 727-733
- ⁹³ Diana L, Cummings W, Cummings DE i wsp. Regulation of ghrelin in physiologic and pathophysiologic states. *J Nutr* 2005; 135: 1320-1325

-
- ⁹⁴ Qi X, Reed J, Englander EW i wsp. Evidence that growth hormone exerts a feedback effect on stomach ghrelin production and secretion. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003; 228: 1028–1032
- ⁹⁵ Hosoda H, Kojima M, Mizushima T i wsp. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by posttranslational processing. *J Biol Chem* 2003; 278: 64-70
- ⁹⁶ Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS i wsp. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med*. 2002; 346: 1623–1630
- ⁹⁷ Stoeckli R, Chanda R, Langer I i wsp. Changes of body weight and ghrelin levels after gastric banding and gastric bypass. *Obes. Res.* 2004; 12: 346-350
- ⁹⁸ Holdstock C, Engstrom BE, Ohrvall M i wsp. Ghrelin and adipose tissue regulatory peptides: Effect of gastric bypass surgery in obese humans. *J Clin Endocrinol metab* 2003; 88: 3177-3183
- ⁹⁹ Tea Yong J, Sangyeoup L, Hyoung Hoi K i wsp. Changes in plasma ghrelin concentration immediately after gastrectomy in patients with early gastric cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5392-5396
- ¹⁰⁰ Roelfsema F, Biermasz NR, Veldman RG i wsp. Growth hormone secretion in patients with an inactivating defect of the GH-releasing hormone receptor is pulsatile: evidence for a role for non-GHRH inputs into the generation of GH pulses. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2459-2464
- ¹⁰¹ Arvat E, Maccario M, Di Vito L I wsp. Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1169–1174
- ¹⁰² Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N I wsp. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4908–4911
- ¹⁰³ Arvat E, Di Vito L, Broglio F i wsp. Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *J Endocrinol Invest* 2000; 23: 493–495
- ¹⁰⁴ Popovic V, Miljic D, Micic D i wsp. Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3450–3453

-
- ¹⁰⁵ Date Y, Murakami N, Toshinai K I wsp. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002; 123: 1120–1128
- ¹⁰⁶ Williams DL, Grill HJ, Cummings DE i wsp. Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology* 2003; 144: 5184–5187
- ¹⁰⁷ Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS i wsp. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 2004; 145: 2607–2612
- ¹⁰⁸ Wren AM, Seal L, Cohen MA i wsp. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5992–5998
- ¹⁰⁹ De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R i wsp. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology* 2004; 145: 4997–5005
- ¹¹⁰ Asakawa A, Inui A, Kaga T, et al. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001; 120: 337–345
- ¹¹¹ Kamegai J, Tamura H, Shimizu T i WSP. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 2001; 50: 2438–2443
- ¹¹² Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K i wsp. 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* 2001; 50: 227–232
- ¹¹³ Andersson U, Filipsson K, Abbott CR i wsp. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem*. 2004; 13(275); 12005–12008
- ¹¹⁴ Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N i wsp. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004; 428: 569–574
- ¹¹⁵ Hewson AK and Dickson SL. Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* 2000; 12: 1047–1049
- ¹¹⁶ Ruter J, Kobelt P, Tebbe JJ I wsp. Intraperitoneal injection of ghrelin induces Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *Brain Res* 2003; 991: 26–33
- ¹¹⁷ Wang L, Saint-Pierre DH, and Tache Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y-synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 2002; 325: 47–51

-
- ¹¹⁸ Wren AM, Seal LJ, Cohen MA i wsp. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5992-6001
- ¹¹⁹ Sakata I, Yamazaki M, Inoue K i wsp. Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion. *Neurosci Lett* 2003; 342: 183–186
- ¹²⁰ Zhang W, Lin TR, Hu Y I wsp. Stuenkel EL, and Mulholland MW. Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Physiol* 2004; 559: 729–737
- ¹²¹ Date Y, Nakazato M, Murakami N i wsp. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 904–907
- ¹²² Andrews PL and Sanger GJ. Abdominal vagal afferent neurones: an important target for the treatment of gastrointestinal dysfunction. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 650–656
- ¹²³ Date Y, Murakami N, Toshinai K i wsp. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002; 123: 1120-1128
- ¹²⁴ Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS i wsp. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50: 1714–1719
- ¹²⁵ Tschöp M, Wawarta R, Riepl RL i wsp. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 2001; 24: 19–21
- ¹²⁶ Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C i wsp. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: 297–304
- ¹²⁷ Callahan HS, Cummings DE, Pepe MS i wsp. Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1319–1324
- ¹²⁸ Foster-Schubert KE, Weigle DS, Callahan HS i wsp. Lipids suppress human plasma ghrelin levels less effectively than do carbohydrates or proteins. *Endocrine Society 86th Annual Meeting, New Orleans, LA; 2004*
- ¹²⁹ Heath RB, Jones R, Frayn KN, Robertson MD. Vagal stimulation exaggerates the inhibitory ghrelin response to oral fat in humans. *J Endocrinol* 2004; 180: 273–281
- ¹³⁰ Druce MR, Wren Am, Park AJ i wsp. Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subject. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2005; 24:1130-1136
- ¹³¹ Kim MS, Yoon CY, Park KH i wsp. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *Neuroreport* 2003; 14: 1317–1320

-
- ¹³² Caixas G, Bashore C, Nash W i wsp. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. *J Clin Endocrinol* 2002; 87: 1902-19012
- ¹³³ Schaller G, Schmidt A, Pleiner J i wsp. Plasma ghrelin concentrations are not regulated by glucose or insuline: a double-blind, placebo-controlled crossover clamp study. *Diabetes* 2003; 52: 16-20
- ¹³⁴ Lipl F, Erdmann J, Atmatzidis S i wsp. Direct effect of leptin on gastric ghrelin secretion. *Horm Metab Res* 2005; 37: 123-125
- ¹³⁵ Schmid D, Held K, Ising M i wsp. Ghrelin stimulates appetite, imagination of food, ACTH, cortysol, ud does not affect leptin in normal controls. *Neuropsychopharmacology* 2005; 1: 1-6
- ¹³⁶ Halem HA, Taylor JE, Dong JZ i wsp. Novel analogs of ghrelin: physiological and clinical implications. *European Journal of Endocrinology* 2004; 151: 71-75
- ¹³⁷ Wren AM, Small CJ, Ward HL i wsp. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 2000; 141: 4325–4328
- ¹³⁸ Witek B, Ochwanowska E, Rafay J i wsp. Effect of ghrelin on activities of some lysosomal hydrolases in rabbits. *Neuro Endocrinol Lett* 2005; 26: 397–400
- ¹³⁹ Masuda Y, Tanaka T, Inomata N i wsp. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 905–908
- ¹⁴⁰ Peeters TL. Central and peripheral mechanisms by which ghrelin regulates gut motility. *J Physiology and Pharmacology* 2003; 54: 95-103
- ¹⁴¹ Trudel L, Tomasetto C, Rio MC i wsp. Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: 948-952
- ¹⁴² Corbetta S, Peracchi M, Cappiello V i wsp. Circulating ghrelin levels in patients with pancreatic and gastrointestinal neuroendocrine tumors: identification of one pancreatic ghrelinoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88: 3117-3120
- ¹⁴³ Papotti M, Cassoni P, Volante M i wsp. Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86: 5052-5059
- ¹⁴⁴ Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS i wsp. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J. Clin Invest* 2004; 114: 57-66

-
- ¹⁴⁵ Asakawa, A. Ghrelin is an appetitestimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*. 2001; 120: 337–345
- ¹⁴⁶ Theander-Carrillo C, Wiedmer P, Cettour-Rose P. Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest* 2006; 10: 1-11
- ¹⁴⁷ Thompson NM, Gill DA, Davies R i wsp. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 2004; 145: 234-242
- ¹⁴⁸ Seon Kim M, Cho Ya Y, Pil Geum J i wsp. The mitogenic and antiapoptotic Actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Molec Endocrino* 2004; 8: 291-301
- ¹⁴⁹ Choi K, Roh SG, Hong YH i wsp. The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology* 2003; 144: 754-759
- ¹⁵⁰ Barazzoni R, Zanetti M, Stebel M i wsp. Hyperleptinemia prevents increased plasma ghrelin concentration during short-term moderate caloric restriction in rats. *Gastroenterology* 2003; 124: 1188-1192
- ¹⁵¹ Tschop M, Weyer C, Tataranni A, Devanarayan V i wsp. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001; 50: 707-709
- ¹⁵² Toshinai K, Mondal M, Nakazato M i wsp. Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia and leptin administration. *Biochem Res Commun* 2001; 281: 1220-1225
- ¹⁵³ Dube M, Beretta E, Dhillon H i wsp. Central leptin gene therapy blocks high-fat diet-induced weight gain, hyperleptinemia and hyperinsulinemia. *Diabetes* 2002; 51: 1729-1736
- ¹⁵⁴ Beretta E, Dube M, Kalra P i wsp. Long-term suppression of weight gain, adiposity and serum insulin by central leptin gene therapy in prepubertal rats: effects on serum ghrelin and appetite-regulating genes. *Pediatr Res*. 2002; 52: 189-198
- ¹⁵⁵ Qian S, Chen H, Weingarth D i wsp. *Mol. Cell. Biol.* 2002; 22; 5027–5035
- ¹⁵⁶ Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD *Nature* 1996; 381: 415–421
- ¹⁵⁷ Gropp E. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat. Neurosci* 2005; 8: 1289–1291
- ¹⁵⁸ Luquet S, Perez FA, Hnasko TS i wsp. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 2005; 310: 683–685
- ¹⁵⁹ Wortley KE, Anderson K, Garcia K i wsp. Deletion of ghrelin reveals no effect on food intake, but a primary role in energy balance. *Obesity Res* 2004; 12: 170-176

-
- ¹⁶⁰ Wortley KE, Anderson KD, Garcia K i wsp. Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8227–8232
- ¹⁶¹ Sun Y, Wang P, Zheng H i wsp. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4679–4684
- ¹⁶² Zigman JM, Nakano Y, Coppari R i wsp. Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005; 115: 3564-3572
- ¹⁶³ Cuntz U, Fruhauf E, Wawarta R i wsp. A role for the novel weight-regulating hormone ghrelin in anorexia nervosa. *Am ClinLab* 2002; 21: 22–23
- ¹⁶⁴ Otto B, Cuntz U, Fruhauf E i wsp. Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 669–673
- ¹⁶⁵ Soriano-Guillen L, Barrios V, Campos-Barros A i wsp. Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J Pediatr* 2004; 144: 36–42
- ¹⁶⁶ Tanaka M, Naruo T, Yasuhara D i wsp. Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 2003; 28: 829–835
- ¹⁶⁷ Vendrell J, Broch M, Villarasa N i wsp. Resisitn, Adiponectin, Ghrelin, Leptin and proinflammatory cytokines: relationship[in obesity. *Obesity research* 2004; 12(6): 962-971
- ¹⁶⁸ Dzaja A, Dalal MA, Himmerich H i wsp. Sleep enhances nocturnal plasma ghrelin levels in healthy subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004.
- ¹⁶⁹ Yildiz BO, Suchard MA, Wong ML i wsp. J. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004
- ¹⁷⁰ English PJ, Ghatei MA, Malik IA i wsp. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2984-2992
- ¹⁷¹ Miraglia del Giudice E, Santoro N, Cirillo G i wsp. Molecular screening of the ghrelin gene in Italian obese children: the Leu72Met variant is associated with an earlier onset of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: 447–450
- ¹⁷² Poykko S, Ukkola O, Kauma H i wsp. Ghrelin Arg51Gln mutation is a risk factor for type 2 diabetes and hypertension in a random sample of middle-aged subjects. *Diabetologia* 2003; 46: 455–458
- ¹⁷³ Ukkola O, Kesaniemi YA i wsp. Preproghrelin Leu72Met polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Intern Med* 2003; 254: 391–394

-
- ¹⁷⁴ Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P i wsp. Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3996–3999
- ¹⁷⁵ Hinney A, Hoch A, Geller F. Ghrelin gene: identification of missense variants and frameshift mutation in extremely obese children and adolescent and healthy normal weight students. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2716–2718
- ¹⁷⁶ Fujiwara Y, Higuchi K, Arafa UA i wsp. Long-term effect of *Helicobacter pylori* eradication on quality of life, body mass index, and newly developed diseases in Japanese patients with peptic ulcer disease. *Hepatology* 2002; 49: 1298–1302
- ¹⁷⁷ Azuma T, Suto H, Ito Y i wsp. Eradication of *Helicobacter pylori* infection induces an increase in body mass index. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16(Suppl 2): 240–244
- ¹⁷⁸ Furuta T, Shirai N, Xiao F i wsp. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on nutrition. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 799–806
- ¹⁷⁹ Gokcel A, Gumurdulu Y, Kayaselcuk F i wsp. *Helicobacter pylori* has no effect on plasma ghrelin levels. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 423–426
- ¹⁸⁰ Suzuki H, Masaoka T, Hosoda H i wsp. Plasma ghrelin concentration correlates with the levels of serum pepsinogen I and pepsinogen I/II ratio—a possible novel and non-invasive marker for gastric atrophy. *Hepatology* 2004; 51: 1249–1254
- ¹⁸¹ Osawa H, Kita H, Ohnishi H i wsp. Changes in plasma ghrelin levels, gastric ghrelin production and body weight after *Helicobacter pylori* cure. *J Gastroenterol* 2006; 41: 954–961
- ¹⁸² Isomoto H, Ueno H, Nishi Y i wsp. Circulating ghrelin level in patients with Various Upper Gastrointestinal Diseases. *Digestive Diseases and Science* 2006; 50(5): 833–838
- ¹⁸³ Nishi Y, Isomoto H, Ueno H i wsp. Plasma leptin and ghrelin concentrations in patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11(46): 7314–7317
- ¹⁸⁴ Tanaka M, Naruo T, Nagai N i wsp. Habitual binge/purge behavior influences circulating ghrelin levels in eating disorders. *J Psychiatr Res* 2003; 37: 17–22
- ¹⁸⁵ Nicholls RD i Knepper JL. Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2001; 2: 153–175
- ¹⁸⁶ DelParigi A, Tschop M, Heiman ML i wsp. High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in prader-willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5461–5464
- ¹⁸⁷ Krsek M, Rosicka M, Papezova H i wsp. Plasma ghrelin levels and malnutrition: a comparison of two etiologies. *Eat Weight Disorders* 2003; 8: 207–211

-
- ¹⁸⁸ Cassoni P, Papotti M, Ghe C i wsp. Identification, characterization and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogues in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1738-1745
- ¹⁸⁹ Korbonitas M, Kojima M, Kangawa K i wsp. Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine* 2001; 14: 101-104
- ¹⁹⁰ Volante M, Allia E, Gugliotta P i wsp. Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1300-1308
- ¹⁹¹ Duxbury MS, Waseem T, Ito H i wsp. Ghrelin promotes pancreatic adenocarcinoma cellular proliferation and invasiveness. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 464-468
- ¹⁹² Ekeblad S, Nilsson B, Lejonklou MH i wsp. Gastrointestinal stromal tumors express the orexigen ghrelin. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 963-970
- ¹⁹³ Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE i wsp. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 400-409
- ¹⁹⁴ Zhigang Wang, Weigang Wang, Wencai Qui i wsp. Involvement of ghrelin-growth hormone secretagogue receptor system in pathoclinical profiles of digestive system cancer. *Acta Biochem et Biophysica Sinica* 2007;39(12): 992-998
- ¹⁹⁵ Cassoni P, Papotti M, Ghe C i wsp. Identification, characterization and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogues in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1738-1745
- ¹⁹⁶ Jeffery PL, Herington AS, Chopin LK. Expression and action of the growth hormone releasing peptide ghrelin and its receptor in prostate cancer cell lines. *J Endocrinol* 2002; 172: 7-11
- ¹⁹⁷ Murata M, Okimura Y, Iida K i wsp. Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 5667-5674
- ¹⁹⁸ De Martel C, Haggerty TD, Douglas AC. Serum ghrelin levels and risk of subsequent adenocarcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1-7
- ¹⁹⁹ Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 862-871
- ²⁰⁰ Shimizu Y, Nagaya N, Isobe T i wsp. Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res*. 2003; 9: 774-778

-
- ²⁰¹ Wolf I, Sadetzki S, Kanety H i wsp. Adiponectin, Ghrelin, and Leptin in Cancer Cachexia in Breast and Colon Cancer Patients. *Cancer* 2006; 106: 966–973
- ²⁰² Garcia JM, Garcia-Touza M, Hijazi RA i wsp. Active ghrelin levels and active to total ghrelin ratio in cancer-induced cachexia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(5): 2920-2926
- ²⁰³ Neary NM, Small CJ, Wren AM i wsp. Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial. *J clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2832-2836
- ²⁰⁴ Neary NM, Small CJ, Wren AM i wsp. Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 2832–2836
- ²⁰⁵ Komninou D, Ayonote A, Riche JP i wsp. Insuline resistance and its contribution to colon carcinogenesis. *Med* 2003; 228: 396-405
- ²⁰⁶ Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K i wsp. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. *N Engl J Med* 2003; 348: 1625–1638
- ²⁰⁷ Pan SY, Johnson KC, Ugnat AM et al. Association of obesity and cancer risk in Canada. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 259–268
- ²⁰⁸ Wren AM, Small CJ, Ward HL i wsp. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 2000; 141: 4325–4328
- ²⁰⁹ Witek B, Ochwanowska E, Rafay J i wsp. Effect of ghrelin on activities of some lysosomal hydrolases in rabbits. *Neuro Endocrinol Lett* 2005; 26: 397–400
- ²¹⁰ Kaaks R & Lukanova A. Energy balance and cancer: the role of insulin and insulin-like growth factor-I. *Proc. Nutr Soc* 2001; 60: 91–106
- ²¹¹ Furstenberger G & Senn H. Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol* 2002; 3: 298–302
- ²¹² Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A i wsp. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 2000; 21: 215–244
- ²¹³ Bruce WR, Wolever TM, Giacca A. Mechanisms linking diet and colorectal cancer: the possible role of insulin resistance. *Nutr Cancer* 2000; 37: 19-26
- ²¹⁴ Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *J Nutr* 2001; 121: 3109-3120
- ²¹⁵ Broglio F, Gottero C, Benso A i wsp. Ghrelin and the endocrine pancreas. *Endocrine* 2003; 22: 1924-1928

-
- ²¹⁶ Jurimae J, Cicchella A i wsp. Regular physical activity influences plasma ghrelin concentration in adolescent girls. *Med Sci Sports Exerc.* 2007; 39(10):1736-41
- ²¹⁷ Popovis V, Damjanovic S, Micic D i wsp. Increased incidence of neoplasia in patients with pituitary adenomas. The Pituitary Study Group. *Clin Endocrinol* 1998; 49: 441-445
- ²¹⁸ Jenkins PJ, Besser M. Clinical perspective: acromegaly and cancer: a problem. *J Clin Endocrinol metab* 2001; 86: 2935-2941
- ²¹⁹ Cheung NW, Boyages SC. Increased incidence of neoplasia in females with acromegaly. *Clin Endocrinol* 1997; 47:323-327
- ²²⁰ Bustin SA, Jenkins PJ. The growth hormone-insulin-like growth factor I axis and colorectal cancer. *Trends Mol Med* 2001; 7: 447-454
- ²²¹ Colao A, Marzullo P, Spiezia S i wsp. Effect of growth hormone and insulin-like growth factor I on prostate diseases: an ultrasonographic and endocrine study in acromegaly, GH deficiency and healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1986-1991
- ²²² Maison P, Balkau B, Simon D i wsp. Growth hormone as a risk for premature mortality in healthy subjects: data from the Paris prospective study. *Br Med J* 1998; 316: 1132-1133
- ²²³ Yu H, Berkel H, Insulin-like growth factors and cancer. *J La State Med Soc* 1999; 151: 218-223
- ²²⁴ Pinski J, Schally AV, Groot K i wsp. Inhibition of growth of human osteosarcomas by antagonists of growth hormone-releasing hormone. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1787-1794
- ²²⁵ Jungwirth A, Schally AV, Pinski J i wsp. Growth hormone-releasing hormone antagonist MZ-4-71 inhibits in vivo proliferation of Caki-I renal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5810-5813
- ²²⁶ Kiaris H, Schally AV, Groot K i wsp. Decrease in telomerase activity in U-87MG human glioblastomas after treatment with an antagonist of growth hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 226-231
- ²²⁷ Szepeshazi K, Schally AB, Groot K i wsp. Antagonists of growth hormone-releasing hormone inhibit IGF-II production and growth of HT-29 human colon cancers. *Br J Cancer* 2000; 82: 1724-1731
- ²²⁸ Kahan Z, Arencibia JM, Csernus VJ i wsp. Expression of GHRH messenger ribonucleic acid and the presence of biologically active GHRH in human breast, endometrial and ovarian cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 582-589
- ²²⁹ Hirose Y, Hata K, Kuno T i wsp. Enhancement of development of azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in C57BL/KsJ-db/db mice. *Carcinogenesis* 2004; 25: 821-825

-
- ²³⁰ Stattin P, Palmqvist R, Soderberg S i wsp. Plasma leptin and colorectal cancer risk: a prospective study in Northern Sweden. *Oncol Rep* 2003; 10: 2015–2021
- ²³¹ Somasundar P, Yu AK, Vona-Davis L i wsp. Differential effects of leptin on cancer in vitro. *J Surg Res* 2003; 113: 50–55
- ²³² Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R et al. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2476–2481
- ²³³ Raju J, McCarthy B, Bird RP. Steady state levels of transforming growth factor-beta1 and beta2 mRNA and protein expression are elevated in colonic tumors in vivo irrespective of dietary lipids intervention. *Int J Cancer* 2002; 100: 635–641
- ²³⁴ Ogunwobi OO, Beales IL. Adiponectin stimulates proliferation and cytokine secretion in colonic epithelial cells *Regul Pept* 2006
- ²³⁵ Min SK, Cho YY, Pil GJ i wsp. The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2004; 18(9): 2291-2301
- ²³⁶ Ott V, Fasshauer M, Dalski A i wsp. Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression. *Horm Metab Res* 2002; 36: 640-645
- ²³⁷ Cowey SL, Quast M, Belacazar LM i wsp. Abdominal obesity, insulin resistance and colon carcinogenesis are increased in mutant mice lacking gastrin gene expression. *Cancer* 2005; 103: 2643-2653
- ²³⁸ Arosio M, Ronchi CL, Gebbia C i wsp. Stimulatory effects of ghrelin on circulating somatostatin and pancreatic polypeptide levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 701-704
- ²³⁹ Murata M, Okimura Y, Iida K i wsp. Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 5667-5674
- ²⁴⁰ Hoshino R, Chatani Y, Yamori T i wsp. Constitutive activation of the 41-43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 1999; 8(3): 813-822
- ²⁴¹ Jeffery PL, Herington AC, Chopin LK. Expression and action of the growth hormone releasing peptide ghrelin and its receptor in prostate cancer cell lines. *J Endocrinol* 2002; 172: 7-11
- ²⁴² Sattler HP, Lensch R, Rohde V i wsp. Novel amplification unit at chromosome 3q25-27 in human prostate cancer. *Prostate* 2000; 45: 207-215
- ²⁴³ Sugita M, Tanaka N, Davidson S i wsp. Molecular definition of a small amplification domain within 3q26 in tumors of cervix, ovary and lung. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 117: 9-18

-
- ²⁴⁴ Mohlig M, Spranger J, Otto B i wsp. Euglycemic hyperinsulinemia, but not lipid infusion, decreases circulating ghrelin levels in humans. *J Endocrinol Invest* 2002; 25, 36–38
- ²⁴⁵ Poppitt SD, Leahy FE, Keogh GF i wsp. Effect of high-fat meals and fatty acid saturation on postprandial levels of the hormones ghrelin and leptin in healthy men. *European Journal of Clinical Nutrition* 2006; 60: 77–84
- ²⁴⁶ English PJ, Ghatei MA, Malik IA i wsp. Food fails to suppress ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2984–2992
- ²⁴⁷ Stratis Ch, Alexandrides T, Vagenas K i wsp. Ghrelin and Peptide YY levels after a variant of biliopancreatic diversion with Roux-en-Y gastrin bypass versus after colectomy: a prospective comparative study. *Obesity Surgery* 2006; 16: 752–758
- ²⁴⁸ Haqq AM, Farooqi IS, O’Rahilly S i wsp. Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader–Willi syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88: 174–178
- ²⁴⁹ Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS i wsp. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50: 1714–1719
- ²⁵⁰ Greenman Y, Golani N, Gilad S i wsp. Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner. *Clin Endo* 2004; 60: 382–388
- ²⁵¹ Casabiell X, Pineiro v, Vega F i wsp. Leptin, reproduction and sex steroids. *Pituitary* 2001; 4: 93–99
- ²⁵² Maccairo M, Aimaretti G, Corneli G i wsp. Short-term fasting abolishes the sex-related difference in GH and leptin secretion in humans. *Amer J Physiol Endo and metab* 2000; 279: 411–416
- ²⁵³ Bergstrom A, Pisani P, Tenet V i wsp. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer* 2001; 91: 421–430
- ²⁵⁴ Ikezaki A, Hosoda H, Ito K i wsp. Fasting plasma ghrelin levels are negatively correlated with insulin resistance and PAI-1, but not with leptin, in obese children and adolescents. *Diabetes* 2002; 51: 3408–3411
- ²⁵⁵ Fouladiun M, Koemer U, Bosaeus I i wsp. Body Composition and Time Course Changes in Regional Distribution of Fat and Lean Tissue in Unselected Cancer Patients on Palliative Care—Correlations with Food Intake, Metabolism, Exercise Capacity, and Hormones. *Cancer* 2005; 103: 2189–98

²⁵⁶ Fouladiun M, Koemer U, Bosaeus I i wsp. Body Composition and Time Course Changes In Regional Distribution of Fat and Lean Tissue In Unselected Cancer Patients on Palliative Care—Correlations with Food Intake, Metabolism, Exercise Capacity, and Hormones. *Cancer* 2005;103:2189–98

²⁵⁷ Tannenbaum A. The intiation and growth of tumors. *Amer J cancer* 1940; 38: 335-350

²⁵⁸ Pariza Mw. Fat, calories and mam mary carcinogenesis: net energy effects. *Amer J Clin Nutr* 1987; 45: 261-263

²⁵⁹ de Marte C, Haggerty TD, Corley DA i wsp. Serum Ghrelin Levels and Risk of Subsequent Adenocarcinoma of the Esophagus. *Am J Gastro* 2007; 102 (6): 1166–1172