

اثر گرلین اگزوزن بر تغییر سطح آنزیم‌های کبدی ناشی از لیپوپلی ساکارید باکتریایی در موش‌های صحرایی

وجیه سبزی فرد^۱ (MSc)، سهیلا ابراهیمی وسطی کلایی^{۲*} (PhD)، جواد چراغی^۳ (PhD)، کوروش سایه میری^۴ (PhD)

۱- دانشگاه پیام نور تهران

۲- گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور مرکز بابل

۳- گروه دامپزشکی آموزشکده دامپزشکی دانشگاه ایلام

۴- گروه آمار زیستی دانشگاه علوم پزشکی ایلام

دریافت: ۸۹/۵/۱۲، اصلاح: ۸۹/۷/۱۴، پذیرش: ۸۹/۱۱/۲۰

خلاصه

سابقه و هدف: لیپوپلی ساکارید باکتریایی بخشی از دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی است که بیشتر وقایع مربوط به عفونت را میانجیگری می‌کند. کبد نقش اصلی را در تولید پاسخ التهابی به لیپوپلی ساکارید دارد. افزایش غلظت آنزیم‌های کبدی یکی از عمده ترین تغییرات ایجاد شده در فاز حاد فرآیند التهاب ناشی از عفونت و یا آسیب بافتی است. گرلین هورمونی پپتیدی بوده که عمدتاً توسط معده تولید شده و سبب تحریک ترشح هورمون رشد می‌گردد. با توجه به اثرات ضد التهابی گرلین در این مطالعه اثر حفاظتی این هورمون بر هیپاتوتوکسیستیتی ناشی از مصرف لیپوپلی ساکارید مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها: این مطالعه تجربی بر روی ۴۰ سر موش صحرایی در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام شد. ابتدا موش‌ها به چهار گروه ده تایی تقسیم شدند. گروه کنترل سرم فیزیولوژی، گروه دوم لیپوپلی ساکارید ۱۰ mg/kg، گروه سوم گرلین ۴ nmol/kg و گروه چهارم گرلین ۴ nmol/kg و لیپوپلی ساکارید ۱۰ mg/kg را بصورت داخل صفاقی به مدت ۸ روز دریافت نمودند. در پایان روز هشتم حیوانات بیهوش شده و پس از باز کردن حفره شکمی، خونگیری مستقیماً از قلب انجام گرفت. به منظور تعیین هیپاتوتوکسیستیتی غلظت آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و گاماگلوتامیل ترانس پپتیداز (GGT) در هر چهار گروه ارزیابی گردید.

یافته ها: تزریق لیپوپلی ساکارید سبب افزایش معنی داری در غلظت آنزیم‌های ALT، AST، ALP و GGT در مقایسه با گروه کنترل گردید ($p < 0.001$). درمان با گرلین بصورت معنی داری افزایش سطح آنزیم‌های ALT، AST، ALP و GGT ناشی از مصرف لیپوپلی ساکارید را برطرف نمود ($p < 0.001$).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده مشخص گردید که احتمالاً گرلین دارای اثر حفاظتی در برابر آسیب‌های کبدی ناشی از تزریق لیپوپلی ساکارید در موش‌ها است. به نظر می‌رسد این اثر حفاظتی از طریق اثرات ضد التهابی گرلین میانجیگری گردد.

واژه های کلیدی: گرلین، هیپاتوتوکسیستیتی، لیپوپلی ساکارید، آنزیم‌های کبدی.

مقدمه

این باورند که افزایش تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی در آسیب‌های بافتی ایجاد شده توسط لیپوپلی ساکارید نقش دارد (۳و۴). بخش عمده لیپوپلی ساکارید توسط سلول‌های کوپفر، آندوتلیال و پارانشیمال کبد از خون برداشته می‌شود. در میان این سلول‌ها، سلول‌های کوپفر بیشترین نقش را در پاکسازی خون از لیپوپلی

لیپوساکارید بخشی از غشا خارجی باکتری‌های گرم منفی بوده که در بروز شرایط پاتولوژیک در بیماری‌هایی نظیر شوک عفونی، کولستاز و زخم معده و روده ناشی از هلیکوباکتریلوری نقش دارد (۱و۲). این ماده، آندوتوکسینی بسیار قوی بوده که پاسخ‌های التهابی را در بافت‌ها راه اندازی می‌کند. برخی از محققین بر

این مقاله حاصل پایان نامه وجیه سبزی فرد دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی دانشگاه پیام نور مرکز تهران می‌باشد.

* مسئول مقاله:

e-mail: s_ebrahimi@pnu.ac.ir

آدرس: بابل، دانشگاه پیام نور، تلفن: ۰۱۱۱-۲۲۵۷۷۸۲

و فرایندهای فیزیولوژیکی در بدن اعمال می کنند (۱۴). همچنین مشخص شده در سطح سلول های کوپفر گیرنده های سمپاتیکی وجود دارد. آندوتوکسین باکتریایی از طریق این گیرنده ها سبب تنظیم افزایشی $TNF-\alpha$ و راه اندازی پاسخ های التهابی می گردد. گرلین با مهار این گیرنده ها تولید $TNF-\alpha$ را کاهش می دهد (۴).

با توجه به تحقیقات انجام شده و احتمال دارا بودن خاصیت ضد التهابی گرلین، در مطالعه حاضر برای اولین بار اثر حفاظتی گرلین اگزوزن بر هپاتوکسیسیتی ناشی از لیپوپلی ساکارید در موش های آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

در این تحقیق تجربی از ۴۰ سر موش آزمایشگاهی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات به مدت یک هفته در شرایط یکسان کنترل شده از نظر میزان نور (۱۲ ساعت روشنایی / تاریکی به طور متناوب) و دمای $22 \pm 3^\circ C$ داخل قفس نگهداری شدند. آب و غذا به طور آزادانه در اختیار حیوانات قرار داده شد. حیوانات به طور تصادفی به ۴ گروه ده تایی تقسیم شدند. گروه اول (گروه کنترل) ۰/۵ میلی لیتر نرمال سالین را روزانه بصورت داخل صفاقی به مدت ۸ روز متوالی دریافت کردند. به منظور ایجاد هپاتوتوکسیسیتی به گروه دوم (گروه لیپوپلی ساکارید) بصورت روزانه ۱۰ mg/kg لیپوپلی ساکارید (کمپانی سیگما) بصورت داخل صفاقی به مدت هشت روز تزریق شد. گروه سوم (گروه گرلین) بصورت روزانه ۴ nmol/kg گرلین (کمپانی توکریس) بصورت داخل صفاقی به مدت هشت روز تزریق شد. دوز موثر گرلین بر اساس مطالعات مقدماتی انجام شده و دوز لیپوپلی ساکارید بر اساس مطالعات قبلی انتخاب گردید (۱۰). به منظور ارزیابی اثر حفاظتی گرلین، گروه چهارم (گروه درمانی) هم زمان با لیپوپلی ساکارید بصورت روزانه ۱۰ mg/kg و به مدت ۸ روز تحت درمان با گرلین ۴ nmol/kg قرار گرفت. کلیه تزریق ها در ساعت ۱۲ ظهر انجام شد.

در پایان روز هشتم پس از بیهوش کردن حیوانات و باز کردن قفسه سینه خونگیری از قلب انجام گرفت. نمونه های خونی به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ بار در دقیقه سانتریفوژ گردیده و سرم آنها جدا شد. جهت ارزیابی آسیب کبدی سطح پلاسمایی آنزیم های کبدی ALT، AST، ALP و GGT با استفاده از روش اسپکتروفتومتری (دستگاه SINCO) و کیت های اختصاصی (شرکت پارس آزمون) بطور غیرمستقیم اندازه گیری شد.

جهت تعیین تفاوت بین میانگین ها از آنالیز واریانس یک طرفه و متعاقب آن تست Dunnett استفاده و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

طبق نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر مصرف لیپوپلی ساکارید بصورت معنی داری سبب افزایش مقدار ALT ($26/33 \pm 0/27$)، AST ($41/10 \pm 0/28$)، ALP ($105/3 \pm 4/88$) و GGT ($4/46 \pm 0/18$) در مقایسه با گروه کنترل (به ترتیب $7/34 \pm 0/21$ ، $19/35 \pm 0/2$ ، $0/4 \pm 0/49$ ، $2/57 \pm 0/09$) گردید ($p < 0/001$).

ساکارید دارند (۲). سلول های پارانشیمال کبد پروتئینی موسوم به پروتئین اتصالی به لیپوپلی ساکارید به داخل خون ترشح می کنند. این پروتئین پس از اتصال به لیپوپلی ساکارید توسط گیرنده های موجود در سطح سلول های کوپفر شناسایی می شود (۱۵ و ۱۶). بدنبال اتصال لیپوپلی ساکارید به این گیرنده ها این سلول ها فعال شده و شروع به آزاد کردن سایتوکاین هایی نظیر فاکتور نکروز کننده تومور آلفا ($TNF-\alpha$)، انواعی از اینترلوکین ها و پروستاگلاندین ها می کنند. این سایتوکاینها مسئول راه اندازی واکنش های التهابی هستند (۸-۱۰). مطالعات مختلف نشان می دهند که استفاده از موادی با اثرات ضد التهابی می تواند آسیب کبدی ناشی از لیپوپلی ساکارید را کاهش دهد (۱۶ و ۱۷). گزارش شده که لیپوپلی ساکارید ساخت سایتوکاین های التهابی توسط هپاتوسیت ها را نیز تحریک کرده و در پاسخ به آن روندهای ترمیمی در بافت کبد آغاز می گردد (۱۰ و ۹). تحت شرایط عادی این آنزیم ها درون سلول های کبدی یا هپاتوسیت ها وجود دارند، اما زمانی که کبد آسیب می بیند این آنزیم ها وارد جریان خون شده و می توانند برای تشخیص و کنترل آسیب های کبدی مفید باشند (۱۱).

گرلین هورمونی پپتیدی با ۲۸ اسید آمینه می باشد که بیشتر توسط سلول های مخاط معده ترشح شده و سبب تحریک هورمون رشد می گردد. اثرات بیولوژیکی گرلین از طریق گیرنده های هورمون آزاد کننده هورمون رشد یا GHSR (Growth Hormone Secretagogue Receptor) القا می گردد. این گیرنده ها در بسیاری از بافت ها از جمله کبد یافت می شوند (۱۰ و ۷). در کبد گرلین با افزایش شکست گلیکوژن، تحریک گلوکونوژنز و افزایش آزادسازی کاتکول آمین ها سبب افزایش مقدار گلوکز می گردد (۱۰). وجود گیرنده های گرلین بر روی غشا لنفوسیت ها، نوتروفیل ها و ماکروفاژها این تصور را ایجاد نموده که احتمالاً گرلین در تعدیل سیستم ایمنی دخالت دارد (۵). برای اولین بار در سال ۲۰۰۷ گزارش گردید که آگونیست گیرنده گرلین دارای اثرات ضد التهابی است (۲). علاوه بر این در چندین مطالعه نشان داده شده که گرلین دارای اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی بوده و با مهار تولید سایتوکاین های موثر در التهاب مثل فاکتور نکروز کننده تومور آلفا ($TNF-\alpha$) اثرات ضد التهابی خود را اعمال می کند (۱۶ و ۱۷). گرلین بطور مشخصی سبب کاهش سایتوکاین های التهابی در جریان خون موش های مبتلا به شوک عفونی می گردد (۱۱). مشخص شده که در بیماری کولستاز یا انسداد مجاری صفراوی تغییراتی در بافت کبد رخ داده که منجر به شروع پاسخ های التهابی می گردد (۱۲). مطالعات مختلف نشان می دهند که مصرف لیپوپلی ساکارید منجر به راه اندازی پاسخ های التهابی شده و در ایجاد کولستاز کبدی دخالت دارد (۱۲ و ۹). در طی التهاب فعالیت بیگانه خواری سلول های کوپفر زیاد شده و پاسخ دهی این سلول ها به آندوتوکسین ها و لیپوپلی ساکارید افزایش می یابد (مقدار این پروتئین در کولستاز کبدی بالا می رود). احتمال دارد افزایش حساسیت به آندوتوکسین در طی التهاب در القا ساخت سایتوکاین های پیش التهابی و افزایش پراکسیداسون لیپیدی دخالت داشته باشد (۱۲). گرلین پپتید نسبتاً جدیدی است که بعنوان محرک ترشح هورمون رشد در نظر گرفته می شود. اگرچه بخش عمده گرلین در بدن توسط معده ترشح می گردد ولی غلظت های اندکی از این هورمون را می توان در سایر بافت های محیطی و مرکزی نیز پیدا نمود. اثرات بیولوژیکی گرلین از طریق گیرنده های GHSR القا می گردد. این گیرنده ها در بسیاری از بافت ها از جمله کبد یافت می شوند (۱۳). گرلین از طریق این گیرنده ها نقشی حیاتی در بسیاری از بیماریها

گروه لیپوپلی ساکارید کاهش معنی داری نشان داد ($p < 0.001$). مصرف توام گرلین و لیپوپلی ساکارید سبب کاهش معنی دار این نسبت در مقایسه با سه گروه دیگر می شد ($p < 0.001$) (جدول ۲).

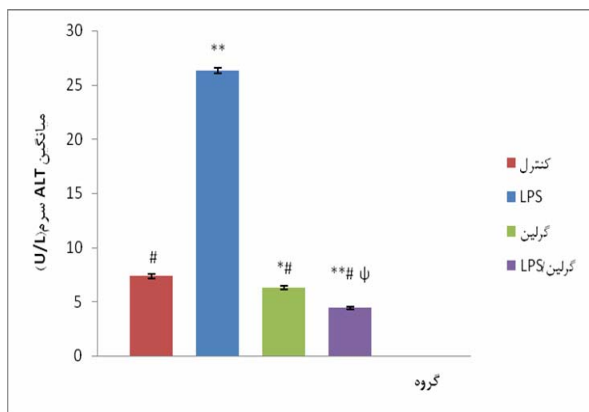
جدول ۲: مقایسه نسبت AST:ALT و ALT:AST در گروههای مورد

مطالعه	گروه	ALT:AST	AST:ALT
	کنترل	0.37 ± 0.01	2.64 ± 0.08
	LPS	$0.63 \pm 0.06^*$	$1.56 \pm 0.18^*$
	گرلین	$0.39 \pm 0.08^{* \#}$	$3.39 \pm 0.09^{* \#}$
	گرلین + LPS	$0.20 \pm 0.06^{* \# \psi}$	$4.95 \pm 0.14^{* \# \psi}$

*: تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.001$).

#: تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه LPS ($p < 0.001$).

ψ: تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه گرلین ($p < 0.001$).

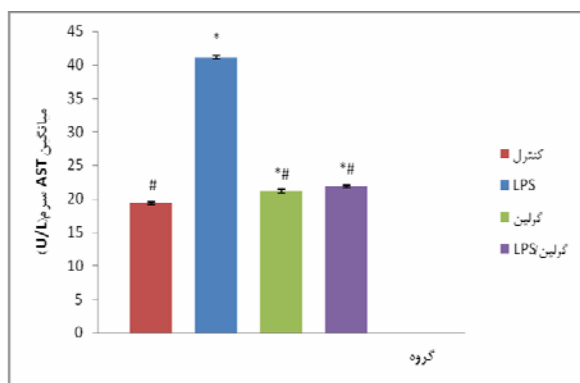


نمودار ۱. مقایسه میانگین غلظت سرمی آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در گروههای مورد مطالعه.

*: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.05$). **: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.001$).

#: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید ($p < 0.001$).

ψ: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه گرلین ($p < 0.001$).



نمودار ۲. مقایسه میانگین غلظت سرمی آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز (AST) در گروههای مورد مطالعه.

*: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.01$). **: وجود تفاوت معنی دار

در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.001$). #: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید ($p < 0.001$).

تاثیر گرلین بر غلظت آنزیم های کبدی: گرلین به تنهایی سبب

کاهش مقدار ALT (6.3 ± 0.16) در مقایسه با گروه کنترل شد (7.34 ± 0.21) ($p < 0.05$) (نمودار ۱). مقدار AST در گروه دریافت کننده گرلین (2.1 ± 0.24) در مقایسه با گروه کنترل (1.9 ± 0.2) افزایش معنی داری نشان داد ($p < 0.01$) (نمودار ۲). مقدار آنزیم ALP (73.3 ± 0.33) در مقایسه با گروه کنترل (76.4 ± 0.49) کاهش معنی داری را نشان داد ($p < 0.01$) (نمودار ۳) در حالیکه گرلین بر مقدار آنزیم GGT در مقایسه با گروه کنترل، تاثیری نداشت (نمودار ۴) (جدول ۱).

جدول ۱: آنزیم های کبدی اندازه گیری شده در گروه های مختلف

گروه	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALP(U/L)	GGT(U/L)
کنترل	7.34 ± 0.21	1.9 ± 0.2	76.4 ± 0.49	2.57 ± 0.09
LPS	2.6 ± 0.27	4.1 ± 0.28	105.3 ± 4.88	4.46 ± 0.18
گرلین	6.3 ± 0.16	2.1 ± 0.24	73.3 ± 0.33	2.5 ± 0.1
گرلین + LPS	4.4 ± 0.13	2.1 ± 0.22	80.77 ± 0.1	2.77 ± 0.19

تاثیر مصرف توام گرلین و لیپوپلی ساکارید بر غلظت آنزیم های

کبدی: درمان با گرلین بصورت معنی داری افزایش سطح آنزیم ALT (4.4 ± 0.13) واحد در هر لیتر) ناشی از مصرف لیپوپلی ساکارید را نه تنها کاهش داد ($p < 0.001$) بلکه در مقایسه با گروه کنترل نیز مقدار آن را کاهش داد ($p < 0.001$). مقدار ALT در دو گروه گرلین و گروه گرلین + لیپوپلی ساکارید تفاوت معنی داری نشان نداد (نمودار ۱). پس از درمان با گرلین نه تنها مقدار AST (2.1 ± 0.22) واحد در هر لیتر) در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید کاهش معنی داری را نشان داد ($p < 0.001$) بلکه مقدار آن در مقایسه با گروه کنترل نیز کمتر شد ($p < 0.001$). مقدار AST در دو گروه گرلین و گروه گرلین + لیپوپلی ساکارید تفاوت معنی داری نشان نداد (نمودار ۲). بدنال تزریق توام گرلین و لیپوپلی ساکارید مقدار آنزیم ALP (80.77 ± 0.1) واحد در هر لیتر) اگرچه در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید کاهش معنی داری نشان داد ($p < 0.001$) اما مقدار آن در مقایسه با گروه کنترل و گروه گرلین همچنان بالاتر بود (به ترتیب $p < 0.05$ و $p < 0.01$) (نمودار ۳). در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید مقدار آنزیم GGT (2.77 ± 0.19) واحد در هر لیتر) در گروه درمانی گرلین + لیپوپلی ساکارید کاهش معنی داری نشان داد ($p < 0.001$). بین مقدار این آنزیم در گروه درمانی گرلین + لیپوپلی ساکارید و گروه کنترل و گروه گرلین به تنهایی تفاوت معنی داری وجود نداشت (نمودار ۴) (جدول ۱).

تغییرات نسبت AST:ALT در گروههای مورد مطالعه: با

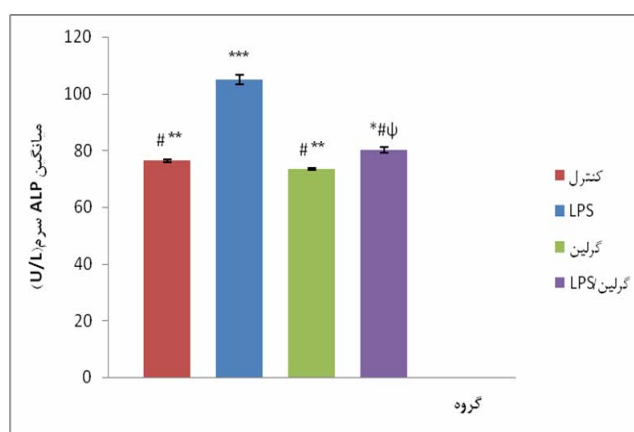
تقسیم مقدار AST به ALT نسبت AST:ALT بدست آمد (۱۲). نتایج نشان داد این نسبت در گروه لیپوپلی ساکارید در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری نشان می دهد ($p < 0.001$). مقدار این نسبت در گروه گرلین در مقایسه با گروه کنترل و گروه لیپوپلی ساکارید افزایش معنی داری نشان داد ($p < 0.001$). مصرف توام گرلین و لیپوپلی ساکارید سبب افزایش معنی داری در این نسبت در مقایسه با سه گروه دیگر شد ($p < 0.001$) (جدول ۲).

تغییرات نسبت ALT:AST در گروههای مورد مطالعه: در

گروه لیپوپلی ساکارید در مقایسه با گروه کنترل این نسبت افزایش معنی داری پیدا کرد ($p < 0.001$). مقدار این نسبت در گروه گرلین در مقایسه با گروه کنترل و

تشخیص هیپاتوتوکسیسیته، ALT ارزش تشخیصی بالاتری در مقایسه با AST دارد (۱۵). از ALT بعنوان مارکری جهت هیپاتوتوکسیسیته ناشی از لیپوپلی ساکارید استفاده می شود (۲۰۹). یکی از دلایل افزایش AST در آسیب سلولهای کبدی کاهش کلیرانس پلاسمایی آن توسط سلولهای آندوتلیومی کبد است (۱۶). این سلول ها مسئول پاکسازی AST از پلاسما هستند بنابراین آسیب این سلول ها منجر به افزایش مقدار این آنزیم و بالا رفتن نسبت AST:ALT می گردد (۱۷). بر این اساس به نظر می رسد در مطالعه حاضر افزایش AST ناشی از مصرف لیپوپلی ساکارید به دلیل آسیب سلول های آندوتلیالی کبد باشد. نسبت AST:ALT در تفکیک بیماری های کبدی از هم مفید است. در سیروز و هپاتیت مقدار این نسبت بالا و در التهاب حاد و کولستاز مقدار آن کاهش می یابد (۱۹ و ۱۸ و ۱۷ و ۱۶). در تحقیق حاضر این نسبت در گروه لیپوپلی ساکارید در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری پیدا کرد. بر این اساس احتمال داده می شود. در این مطالعه لیپوپلی ساکارید سبب بروز التهاب حاد و کولستاز در کبد شده باشد. گزارش شده که در التهاب کبدی مقدار ALT در مقایسه با AST کبدی بالاتر می رود زیرا این آنزیم در مقایسه با AST نسبت به التهاب حساس تر است (۱۸). به همین دلیل در شرایط التهاب حاد کبدی به دلیل بالا رفتن ALT نسبت AST:ALT واقعاً کاهش می یابد. همچنین در هپاتیت حاد نسبت ALT:AST بالا رفته و بر عکس نسبت AST:ALT کاهش می یابد. برخی از محققین عمومی ترین علت افزایش ALT:AST را کبد چرب دانسته و التهاب کبدی را بعنوان یکی از علل رسوب چربی در کبد معرفی می کنند (۱۸). در این مطالعه نیز بدنال مصرف لیپوپلی ساکارید مقدار نسبت ALT:AST تقریباً دو برابر شد. این نتیجه امکان راه اندازی پاسخ های التهابی را در کبد پس از مصرف لیپوپلی ساکارید تقویت می کند.

آنزیم های ALP و GGT روی سطح سلول های پوششی کانیکولهای صفراوی وجود دارند به همین دلیل هر نوع انسدادی در مجاری داخل یا خارج کبدی سبب افزایش مقدار این آنزیم ها می گردد. ولی در آسیب هپاتوسیت ها مقدار ALP و GGT معمولاً افزایش چندانی نمی یابد به همین دلیل سنجش این آنزیم ها در افتراق بین بیماری های پارانشیمی کبد و اختلال صفراوی کاربرد دارد (۱۸ و ۱۱). در این مطالعه مقدار ALP بدنال مصرف لیپوپلی ساکارید افزایش زیادی نشان داد که احتمال ایجاد اختلال صفراوی و کولستاز را بیشتر مطرح می کند. در تحقیق حاضر گرلین توانست افزایش آنزیم های کبدی ناشی از مصرف لیپوپلی ساکارید را برطرف کند. یافته های جدید بیان می دارند که گرلین در سیستم ایمنی و سلول های آندوتلیال دارای اثرات ضد التهابی بسیار قوی می باشد (۵). Waseem و همکارانش گزارش نموده اند که گرلین سبب مهار تولید سایتوکاین های التهابی نظیر اینترلوکین (IL-1)، IL-6 و TNF- α می گردد (۲۰). محققین نشان دادند که دانسته گیرنده های گرلین در موش های مبتلا به بیماری های التهابی نظیر تصلب شرایین در مقایسه با گروه کنترل بالاتر می رود (۱۴). اخیراً گزارش شده که سایتوکاین های پیش التهابی در موش های مبتلا به بیماری مزمن کلیوی که با گرلین درمان می شوند، کاهش می یابد (۲۱). شواهد اخیر نشان می دهند که مصرف گرلین اگزوزن ممکن است شرایط التهابی را بهبود دهد (۵). همچنین گزارش شده که گرلین دارای اثرات ضد التهابی در سلول های آندوتلیالی انسان بوده و تولید سایتوکاین ها توسط سلول های آندوتلیال را در پاسخ به لیپوپلی ساکارید کاهش می دهد (۹). همچنین در بیماران



نمودار ۳. مقایسه میانگین غلظت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در گروههای مورد مطالعه

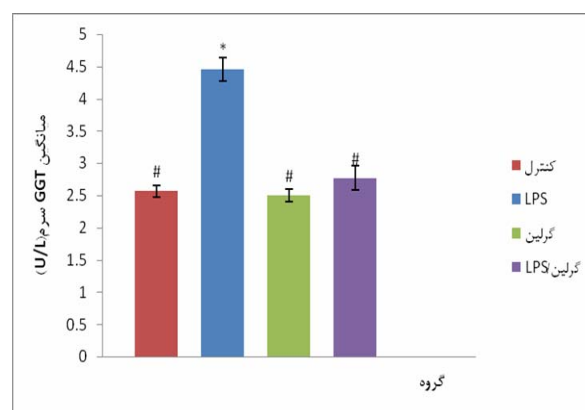
*: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.05$).

**#: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.01$).

***#: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.001$).

#: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید ($p < 0.001$).

ψ#: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه گرلین ($p < 0.01$).



نمودار ۴. مقایسه میانگین غلظت سرمی گاماگلوتامیل ترانس پپتیداز (GGT) در گروههای مورد مطالعه.

*: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0.01$).

#: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید ($p < 0.001$).

بحث و نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که مصرف گرلین اگزوزن قادر است کبد را در برابر آسیب ناشی از لیپوپلی ساکارید حفاظت کند. آنزیم های ALT و AST در داخل سیتوپلاسم سلول های کبدی وجود دارند. در مبتلایان به سیروز، هپاتیت مزمن، هپاتیت الکلی، هپاتیت ویروسی و ایسکمی مقدار این آنزیم ها در خون افزایش می یابد (۱۱). این مطالعه نیز مطابق یافته های سایر محققین مصرف لیپوپلی ساکارید سبب افزایش مقدار ALT و AST گردید. بر خلاف ALT آنزیم AST در سایر بافت ها به غیر از کبد نیز یافت می شود. به همین دلیل در

(Substance, ROS) در آنها افزایش می یابد(۶). بین انسداد مجاری صفراوی و فعالیت آنتی اکسیدانی کبد رابطه منفی وجود دارد. پیشنهاد شده درمان با آنتی اکسیدان ها به دلیل مهار ROS سبب القا اثرات حفاظتی بر وضعیت هپاتوسیت ها و اعمال کبدی می گردد (۲۴و۲۳). لیپوپلی ساکارید سبب القا استرس اکسیداتیو در کبد می گردد. استرس اکسیداتیو در پاتوژنز و پیشرفت بیماری های کبدی نظیر کبد الکلی و سیروز صفراوی دخالت دارد. در طی این فرآیند بیان ژنی ناقلین مسئول خروج صفرا واقع بر روی سلول های پوششی کانیکول های صفراوی تحت تاثیر قرار می گیرند (۲۳و۶۹). این احتمال وجود دارد که گرلین با تثبیت غشا سلولی و حفاظت کبد از سمیت ناشی از رادیکال های آزاد در حفاظت کبد موثر باشد (۱۶). همچنین گزارش شده که هپاتوسیت های کبدی بعد از تحریک توسط لیپوپلی ساکارید مبادرت به تولید اسید نیتریک می کنند (۲۵و۲۹). از سوی دیگر گرلین با کاهش استرس اکسیداتیو سبب سرکوب تولید سایتوکاین های التهابی شده و از این طریق فعالیت اسید نیتریک را نیز تقویت می کند. همچنین گرلین سبب افزایش ساخت اسید نیتریک در سلول های آندوتلیال می گردد (۲۳).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مصرف گرلین اگزوزن قادر است کبد را در برابر آسیب ناشی از لیپوپلی ساکارید حفاظت کند. میتوان تصور نمود که گرلین از طریق اثرات ضد التهابی، هپاتوتوکسیسیته ناشی از لیپوپلی ساکارید را برطرف می کند. همچنین به نظر می رسد اثرات حفاظتی گرلین بیشتر از طریق تاثیر بر روی سلول های غیرپارانشیمی کبد بویژه سلول های کوپفر اعمال شود. البته برای روشن شدن مکانیسم عمل دقیق گرلین به مطالعات بیشتری نیاز است.

مبتلا به بیماری مزمن کبدی بین مارکرهای التهابی و غلظت گرلین ارتباط مثبتی وجود دارد (۲۲). گرلین نه تنها سبب مهار تولید سایتوکاین های التهابی شده بلکه ساخت سایتوکاین های ضد التهابی مثل IL-10 را تحریک کرده و از این طریق در کاهش التهاب نقش دارد (۵). مصرف آنتاگونیست گرلین سبب افزایش تولید سایتوکاین های التهابی در حیوانات طبیعی می گردد (۴). گزارش شده که آگونیست گرلین اثری بر آزادسازی ترانس آمیناز های کبدی از هپاتوسیت های (سلول های پارانشیمی) کبد ندارد اما تولید آنها را در محیط کشت حاوی سلول پارانشیمی همراه با سلول های غیرپارانشیمی کاهش می دهد(۲). مصرف گرلین اگزوزن سبب مهار آزادسازی فاکتورهای التهابی ناشی از $TNF-\alpha$ در محیط کشت حاوی سلول های آندوتلیال ورید بدن انسان می گردد (۱۹). از این رو تصور می گردد اثرات ضد التهابی آگونیست گیرنده گرلین در کبد از طریق سلول های غیر پارانشیمی اعمال گردد (۲). ممانعت از تولید سایتوکاین ها توسط سلول های کوپفر می تواند یکی از مکانیسم های دخیل در اثر حفاظتی گرلین بر هپاتوتوکسیسیته ناشی از لیپوپلی ساکارید باشد. مطابق با این یافته ها در تحقیق حاضر در نتیجه درمان با گرلین به دلیل پایین آمدن مقدار ALT نسبت AST:ALT در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید افزایش پیدا نمود. این نتیجه اثر حفاظتی گرلین را بر جلوگیری از التهاب تایید می کند.

همانطور که اشاره گردید اختلال در انتقال اسیدهای صفراوی از کبد به روده ها منجر به بیماری کولستاز می گردد. این بیماری بیشتر به دلیل آسیب به سلول های پوششی مجاری صفراوی رخ می دهد. بدنبال تجمع اسیدهای صفراوی در کبد سلول های کبدی آسیب دیده و تولید Reactive Oxygen

Effect of Exogenous Ghrelin on Lipopolysaccharide Induced Change Livers Enzyme Level in Rats

V. Sabzifard (MSc)¹, S. Ebrahimi Vosta Kalai (PhD)^{2*}, J. Cheraghi (PhD)³, K. Sayeh Miri (PhD)⁴

1. Payame Noor University, Tehran, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University, Babol, Iran

3. Faculty Of Veterinary, Ilam University, Ilam, Iran

4. Department Of Biostatistics, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

J Babol Univ Med Sci; 13(3); May 2011

Received: Aug 3rd 2010, Revised: Oct 6th 2010, Accepted: Feb 9th 2011.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Bacterial lipopolysaccharide (LPS) is a component of the gram-negative bacterial cell wall and is believed to mediate many of the sequela of infection. The liver plays a central role in the inflammatory response to LPS. Elevation of livers enzyme level is one of changes induced in acute phase of inflammation by infection or tissue damage. Ghrelin is a peptide hormone mainly secreted by the mucosa of the stomach and stimulates growth hormone release. Based on anti-inflammatory effects of Ghrelin, in this study we examined the protective effect of Ghrelin on lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity in rat.

METHODS: In this study forty male Wistar rats (200-250 g) were randomly divided into 4 groups (N=10). Control group received normal saline, second group received LPS (10 mg/kg body weight, i.p), third group received Ghrelin (4 nmol/kg, i.p), and forth group received LPS + Ghrelin (10 mg/kg and 4nmol/kg, respectively) for 8 days. At the end of the 8th day, animals were anaesthetized and blood samples were collected directly from heart. Hepatotoxicity was evaluated by measuring aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and gamma-glutamyl-transpeptidase (GGT).

FINDINGS: Injection of LPS induced a significant increase in AST, ALT, ALP and GGT compared with control group ($p<0.001$). LPS- induced increases in AST, ALT, ALP and GGT were significantly reduced by treatment with Ghrelin ($p<0.001$).

CONCLUSION: In conclusion, our results suggest that Ghrelin has protective effect against LPS- induced hepatotoxicity and this effect may be mediated by anti inflammatory effect of Ghrelin.

KEY WORDS: Ghrelin, Hepatotoxicity, Lipopolysaccharide, Liver enzymes.

*Corresponding Author;

Address: Payame Noor University, Babol, Iran

Tel: +98 111 2257782

E-mail: s_ebrahimi@pnu.ac.ir

References

1. Van Oosten M, Van de Bilt E, Van Berkel TJ, Kuiper J. New scavenger receptor-like receptors for the binding of lipopolysaccharide to liver endothelial and kupffer cells. *Infect Immun* 1998;66(11):5107-12.
2. Granado M, Martin AI, Lopez Mendiuna M, Lopez Calderon A, Villanua MA. GH-releasing peptide-2 administration prevents liver inflammatory response in endotoxemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294(1):E131-41.
3. Slomiany BL, Slomiany A. Ghrelin protection against lipopolysaccharide-induced gastric mucosal cell apoptosis involves constitutive nitric oxide synthase-mediated caspase-3 S-nitrosylation. *Mediators Inflamm* 2010; Article ID 280464. Epub 2010 Mar 30.
4. Shah KG, Wu R, Jacob A, et al. Human ghrelin ameliorates organ injury and improves survival after radiation injury combined with severe sepsis. *Mol Med* 2009;15(11-12):407-14.
5. Ceccanti M, Attili A, Balducci G, et al. Acute alcoholic hepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006;40(9):833-41.
6. Wheeler MD, Thurman RG. Up-regulation of CD14 in liver caused by acute ethanol involves oxidant-dependent AP-1 pathway. *J Biol Chem* 2003;278(10):8435-41.
7. Wang L, Basa NR, Shaikh A, et al. LPS inhibits fasted plasma ghrelin levels in rats: role of IL-1 and PGs and functional implications. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291(4):G611-20.
8. Possamai LA, Antoniadis CG, Anstee QM, et al. Role of monocytes and macrophages in experimental and human acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2010;16(15):1811-19.
9. Yano K, Sekine S, Nemoto K, Fuwa T, Horie T. The effect of dimeric acid on LPS induced downregulation of Mrp2 in the rat. *Biochem Pharmacol* 2010;80(4):533-9.
10. Hataya Y, Akamizu T, Hosoda H, et al. Alterations of plasma ghrelin levels in rats with lipopolysaccharide-induced wasting syndrome and effects of ghrelin treatment on the syndrome. *Endocrinology* 2003;144(12):5365-71.
11. Yap CYF, Choon AW. Liver function tests (LFTs). *Proceedings of Singapore Healthcare* 2010;19(1):80-2.
12. Giboney PT. Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient. *Am Fam Physician* 2005;71(6):1105-10.
13. Wu R, Dong W, Zhou M, Cui X, Hank Simms H, Wang P. Ghrelin improves tissue perfusion in severe sepsis via downregulation of endothelin-1. *Cardiovasc Res* 2005;68(2):318-26.
14. Zhang M, Yuan F, Chen H, Qui X, Fang W. Effect of exogenous ghrelin on cell differentiation antigen 40 expression in endothelial cells. *Acta Biochem Biophys Sin* 2007;39(12):974-81.
15. Alanine Aminotransferase (ALT) and Aspartate Aminotransferase (AST). *Technical Bulletin* 2007; Number 114. Available from: [http:// www.cholesteck.com](http://www.cholesteck.com).
16. Hassan HA, El-Agmy SM, Gaur RL, Fernando A, Rai MH, Ouhtit A. In vivo evidence of hepato- and reno-protective effect of garlic oil against sodium nitrite-induced oxidative stress. *Int J Biol Sci* 2009; 5(3):249-55.
17. Ustundag Y, Bilezikci B, Boyacioglu S, Kayatas M, Odemir N. The utility of AST/ALT ratio as a non-invasive demonstration of the degree of liver fibrosis in chronic HCV patients on long-term haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15(10):1716-7.
18. Fraser A. Interpretation of liver enzyme tests. *Continuing Medical Education* 2002;29(2):117-19.
19. Nyblom H, Berggren U, Balldin J, Olsson R. High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking. *Alcohol Alcohol* 2004;39(4):336-9.
20. Waseem T, Duxbury M, Ito H, Ashley SW, Robinson MK. Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Surgery* 2008;143(3):334-42.

21. Tesauro M, Schinzari F, Caramanti M, Lauro R, Cardillo C. Metabolic and cardiovascular effects of gherlin. *Int J Pept* 2010; 864342. doi: 10.1155/2010/864342.
22. Katergari SA, Milousis A, Pagonopoulou O, Asimakopoulos B, Nikolettos NK. Gherlin in pathological conditions. *Endoc J* 2008;55(3):439-53.
23. Tesauro M, Schinzari F, Rovella A, et al. Gherlin restores the endothelin 1/nitric oxide balance in patients with obesity-related metabolic syndrome. *Hypertension* 2009;54(5):995-1000.
24. Aller MA, Arias JL, Garcia Dominiguez J, Arias JI, Duran M, Arias J. Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2008; 1(1):6.
25. Iseri SO, Sener G, Saglam B, Ercan F, Gedik N, Yege BC. Ghrelin alleviates biliary obstruction-induced chronic hepatic injury in rats. *Regul Pept* 2008;146(1-3):73-9.