Archive of SID

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره سیزدهم، شمارهٔ ۳، اردیبهشت ۱۳۹۰، صفحه ۴۱-۳۴

مقاله تحقیقی

اثر گرلین اگزوژن بر تغییر سطح آنزیم‌های کبدی ناشی از لیپوپلی ساکارید باکتریایی در موش های صحرایی

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

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: لیپوپلی‌ساکارید باکتریایی بخشی از دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی است که بیشتر وقایع مربوط به عفونت را میانجیگری می کند. 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 هپاتوتوکسیستی 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 موش ها به چهار گروه ده تایی تقسیم شدند. گروه کنترل سرم فیزیولوژی، گروه دوم لیپوپلی ساکارید ۱۰mg/kg، گروه سوم گرلین ۴nmol/kg و گروه چهارم گرلین ۴nmol/kg و لیپوپلی ساکارید ۱۰mg/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 هپاتوتوکسیسیتی غلظت آسپارتات‌آمینوترانسفراز (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 آنزیم‌هایALT، ALP،AST و GGT در مقایسه با گروه کنترل گردید ($p<۰/۰۰۱$). درمان با گرلین بصورت معنی‌داری افزایش سطح آنزیم هایALT، AST، ALP و GGT ناشی از مصرف لیپوپلی ساکارید را برطرف نمود ($p<۰/۰۰۱$).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده مشخص گردید که احتمالاً گرلین دارای اثر حفاظتی در برابر آسیب های کبدی ناشی از تزریق لیپوپلی ساکارید در موش ها است. به نظر می رسد این اثر حفاظتی از طریق اثرات ضد التهابی گرلین میانجیگری گردد.

واژه های کلیدی: *گرلین، هپاتوتوکسیسیتی، لیپوپلی‌ساکارید، آنزیم های کبدی.*

مقدمه

لیپوساکارید بخشی از غشا خارجی باکتری های گرم منفی بوده که در بروز شرایط پاتولوژیک در بیماری‌هایی نظیر شوک عفونی، کولستاز و زخم معده و روده ناشی از هلیکوباکترپیلوری نقش دارد (۲و۱). این ماده، آندوتوکسینی بسیار قوی بوده که پاسخ های التهابی را در بافت‌ها راه اندازی می کند. برخی از محققین بر این باورند که افزایش تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی در آسیب‌های بافتی ایجاد شده توسط لیپوپلی ساکارید نقش دارد (۴و۳). بخش عمده لیپوپلی ساکارید توسط سلول‌های کوپفر، آندوتلیال و پارانشیمال کبد از خون برداشته می شود. در میان این سلول‌ها، سلول‌های کوپفر بیشترین نقش را در پاکسازی خون از لیپوپلی

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

* مسئول مقاله:
آدرس: بابل، دانشگاه پیام نور، تلفن: ۲۲۵۷۷۸۲-۰۱۱۱
e-mail:s_ebrahimi@pnu.ac.ir

www.SID.ir

ساکارید دارند (۲). سلول‌های 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 گیرنده‌های موجود در سطح سلول‌های کوپفر شناسایی می شود (۵و۲و۱). بدنبال اتصال لیپوپلی ساکارید به این گیرنده‌ها این سلول‌ها فعال شده و شروع به آزاد کردن سایتوکاین‌هایی نظیر فاکتور نکروز کننده تومور آلفا (TNF-α)، انواعی از اینترلوکین ها و پروستاگلاندین‌ها می‌کنند. این سایتوکاینها مسئول راه‌اندازی واکنش‌های التهابی هستند (۸-۶و۱). مطالعات مختلف نشان می‌دهند که استفاده از موادی با اثرات ضد التهابی می‌تواند آسیب کبدی ناشی از لیپوپلی ساکارید را کاهش دهد (۶و۲). 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 (۱۰و۹). تحت شرایط عادی این آنزیم‌ها درون سلول‌های کبدی یا هپاتوسیت‌ها وجود دارند، اما زمانی که کبد آسیب می‌بیند این آنزیم‌ها وارد جریان خون شده و می‌توانند برای تشخیص و کنترل آسیب‌های کبدی مفید باشند (۱۱).

گرلین هورمونی پپتیدی با ۲۸ اسیدآمینه می باشد که بیشتر توسط سلولهای مخاط معده ترشح شده و سبب تحریک هورمون رشد می‌گردد. اثرات بیولوژیکی گرلین از طریق گیرنده‌های هورمون آزاد کننده هورمون رشد یا GHSR (Growth Hormone Secretagouge Receptor) القا می گردد. این گیرنده ها در بسیاری از بافت ها از جمله کبد یافت می شوند (۱۰و۷). در کبد گرلین با افزایش شکست گلیکوژن، تحریک گلوکونئوژنز و افزایش آزادسازی کاتکول‌آمین ها سبب افزایش مقدار گلوکز می گردد (۱۰). وجود گیرنده‌های گرلین بر روی غشا لنفوسیت‌ها، 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 آکسیدانی بوده و با مهار تولید سایتوکاین های موثر در التهاب مثل فاکتور نکروز کننده تومور آلفا (TNF-α) اثرات ضد التهابی خود را اعمال می کند (۶و۲). 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 (۱۲و۹و۶). 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 سایتوکاین‌های 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 و فرآیندهای فیزیولوژیکی در بدن اعمال می کنند (۱۴). همچنین مشخص شده در سطح سلول‌های کوپفر گیرنده‌های سمپاتیکی وجود دارد. آندوتوکسین باکتریایی از طریق این گیرنده‌ها سبب تنظیم افزایشی TNF-α و راه‌اندازی پاسخ های التهابی می گردد. گرلین با مهار این گیرنده ها تولید TNF-α 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 اگزوژن 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(۱۲ساعت روشنایی/ تاریکی به طور متناوب) و دمای ۲۲±۳ °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 ۱۰mg/kg و به مدت ۸ روز تحت درمان با گرلین ۴nmol/kg قرار گرفت. کلیه تزریق‌ها 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. نمونه‌های 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 وGGT با استفاده از روش اسپکتروفتومتری (دستگاه SINCO) و کیت‌های اختصاصی (شرکت پارس آزمون) بطور غیرمستقیم اندازه‌گیری شد.

جهت تعیین تفاوت بین میانگین ها از آنالیز واریانس یک طرفه و متعاقب آن تست Dunnett استفاده و $p<۰/۰۵$ 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 (۲۶/۳۳±۰/۲۷)، AST (۴۱/۱۰±۰/۲۸)، ALP (۱۰۵/۳±۴/۸۸) و GGT (۴/۴۶±۰/۱۸) در مقایسه با گروه کنترل (به ترتیب ۷/۳۴±۰/۲۱، ۱۹/۳۵±۰/۲، ۷۶/۴±۰/۴۹، ۲/۵۷±۰/۰۹) گردید ($p<۰/۰۰۱$).

www.SID.ir

Archive of SID

تاثیر گرلین بر غلظت آنزیم های کبدی: گرلین به تنهایی سبب کاهش مقدار ALT (۶/۳±۰/۱۶) در مقایسه با گروه کنترل شد (۷/۳۴±۰/۲۱) (p<۰/۰۵) (نمودار۱). مقدار AST در گروه دریافت کننده گرلین (۲۱/۱۰±۰/۲۴) در مقایسه با گروه کنترل (۱۹/۳۵±۰/۲) افزایش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۱) (نمودار۲). مقدار آنزیم ALP (۷۳/۳±۰/۳۳) در مقایسه با گروه کنترل (۷۶/۴±۰/۴۹) کاهش معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۱) (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	۷/۳۴±۰/۲۱	۱۹/۳۵±۰/۲	۷۶/۴±۰/۴۹	۲/۵۷±۰/۰۹
LPS	۲۶/۳۳±۰/۲۷	۴۱/۱۰±۰/۲۸	۱۰۵/۳±۴/۸۸	۴/۴۶±۰/۱۸
گرلین	۶/۳±۰/۱۶	۲۱/۱۰±۰/۲۴	۷۳/۳±۰/۳۳	۲/۵±۰/۱
گرلین + LPS	۴/۴±۰/۱۳	۲۱/۸۳±۰/۲۲	۸۰/۷۷±۰/۱	۲/۷۷±۰/۱۹

تاثیر مصرف توام گرلین و لیپوپلی ساکارید بر غلظت آنزیم های کبدی: درمان با گرلین بصورت معنی‌داری افزایش سطح آنزیم ALT (۴/۴±۰/۱۳ واحد در هر لیتر) ناشی از مصرف لیپوپلی ساکارید را نه تنها کاهش داد (p<۰/۰۰۱) بلکه در مقایسه با گروه کنترل نیز مقدار آن را کاهش داد (p<۰/۰۰۱). مقدار ALT در دو گروه گرلین و گروه گرلین+لیپوپلی ساکارید تفاوت معنی داری نشان نداد(نمودار۱). پس از درمان با گرلین نه تنها مقدار AST (۲۱/۸۳±۰/۲۲ واحد در هر لیتر) در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید کاهش معنی داری را نشان داد (p<۰/۰۰۱) بلکه مقدار آن در مقایسه با گروه کنترل نیز کمتر شد (p<۰/۰۰۱). مقدار AST در دو گروه گرلین و گروه گرلین+لیپوپلی ساکارید تفاوت معنی داری نشان نداد (نمودار ۲). بدنبال تزریق توام گرلین و لیپوپلی ساکارید مقدار آنزیم ALP (۸۰/۷۷±۰/۱ واحد در هر لیتر) اگرچه در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید کاهش معنی داری نشان داد (p<۰/۰۰۱) اما مقدار آن در مقایسه با گروه کنترل و گروه گرلین همچنان بالاتر بود(به ترتیب p<۰/۰۵ و p<۰/۰۰۱) (نمودار۳). در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید مقدار آنزیم GGT (۲/۷۷±۰/۱۹ واحد در هر لیتر) در گروه درمانی گرلین+ لیپوپلی ساکارید کاهش معنی داری نشان داد (p<۰/۰۰۱). 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<۰/۰۰۱). مقدار این نسبت در گروه گرلین در مقایسه با گروه کنترل و گروه لیپوپلی ساکارید افزایش معنی داری نشان داد (p<۰/۰۰۱). مصرف توام گرلین و لیپوپلی ساکارید سبب افزایش معنی داری در این نسبت در مقایسه با سه گروه دیگر شد (p<۰/۰۰۱) (جدول ۲).

تغییرات نسبت ALT:AST در گروههای مورد مطالعه: در گروه لیپوپلی ساکارید در مقایسه با گروه کنترل این نسبت افزایش معنی‌داری پیدا کرد (p<۰/۰۰۱). مقدار این نسبت در گروه گرلین در مقایسه با گروه کنترل و گروه لیپوپلی ساکارید کاهش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۰۱). مصرف توام گرلین و لیپوپلی ساکارید سبب کاهش معنی‌دار این نسبت در مقایسه با سه گروه دیگر می شد (p<۰/۰۰۱) (جدول ۲).

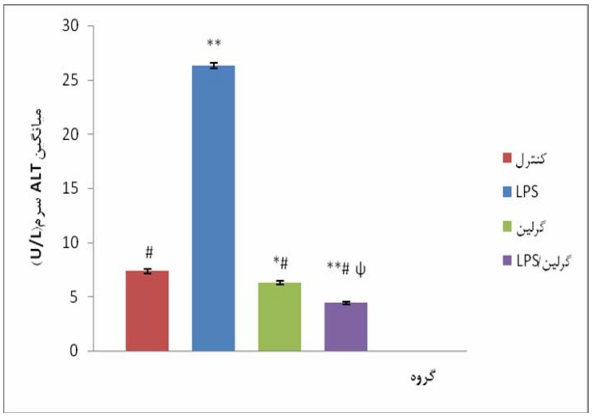
جدول ۲: مقایسه نسبت AST:ALT و ALT:AST در گروههای مورد مطالعه

گروه	AST:ALT	ALT:AST
کنترل	۲/۶۴±۰/۰۸	۰/۳۷±۰/۰۱
LPS	۱/۵۶±۰/۰۱۸*	۰/۶۳±۰/۰۰۶*
گرلین	۳/۳۹±۰/۰۹*#	۰/۲۹±۰/۰۰۸*#
گرلین +LPS	۴/۹۵±۰/۱۴*#ψ	۰/۲۰±۰/۰۰۶*#ψ

*: تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل(p< ۰/۰۰۱).

#: تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه LPS(p< ۰/۰۰۱).

ψ : تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه گرلین(p< ۰/۰۰۱).

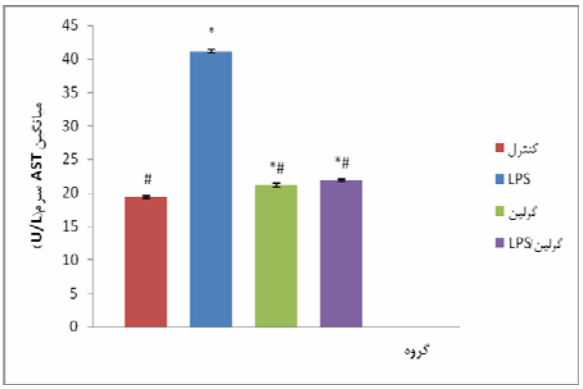


نمودار ۱. مقایسه میانگین غلظت سرمی آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در گروههای مورد مطالعه.

*: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل(p<۰/۰۵). **: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل (p<۰/۰۰۱).

#: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید (p<۰/۰۰۱).

ψ: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه گرلین(p<۰/۰۰۱).

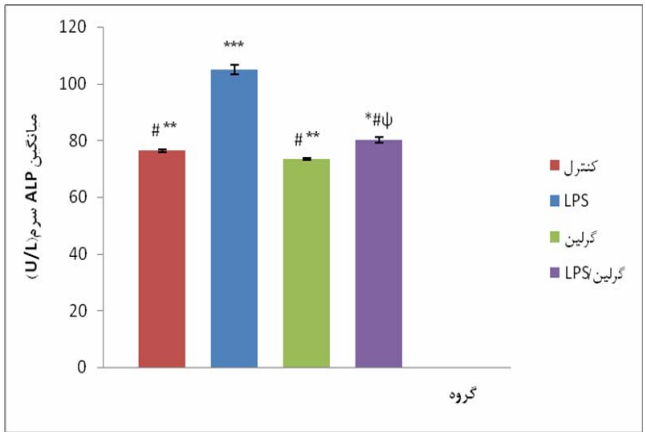


نمودار ۲. مقایسه میانگین غلظت سرمی آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) در گروههای مورد مطالعه.

*: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل (p<۰/۰۱). **: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل (p<۰/۰۰۱). #: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید(p<۰/۰۰۱).

www.SID.ir

Archive of SID



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

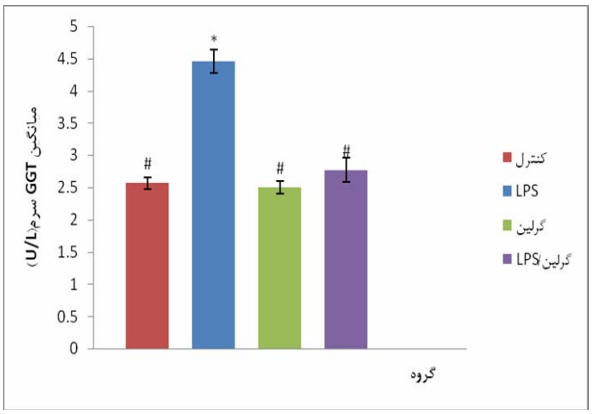
*: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل($p< ۰/۰۵$).

**: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل($p< ۰/۰۱$).

***: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل($p< ۰/۰۰۱$).

#: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید($p< ۰/۰۰۱$).

ψ: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه گرلین($p< ۰/۰۱$).



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

*: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه کنترل($p<۰/۰۰۱$).

#: وجود تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید ($p<۰/۰۰۱$).

بحث و نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که مصرف گرلین اگزوژن قادر است کبد را در برابر آسیب ناشی از لیپوپلی ساکارید حفاظت کند. آنزیم‌های 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 آنزیم‌ها 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 تشخیص هپاتوتوکسیسیتی، ALT ارزش تشخیصی بالاتری در مقایسه با AST دارد (۱۵). از ALT بعنوان مارکری جهت هپاتوتوکسیسیتی ناشی از لیپوپلی ساکارید استفاده می شود (۹و۲). 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 (۱۹و۱۸و۱۲و۱۱). 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 می‌رود 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 می‌یابد. 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 می‌کنند (۱۸). در این مطالعه نیز بدنبال مصرف لیپوپلی ساکارید مقدار نسبتALT:AST تقریباً دو برابر شد. این نتیجه امکان راه‌اندازی پاسخ‌های التهابی را در کبد پس از مصرف لیپوپلی ساکارید تقویت می‌کند.

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 نمی‌یابد به همین دلیل سنجش این آنزیم ها در افتراق بین بیماری‌های پارانشیمی کبد و اختلال صفراوی کاربرد دارد (۱۸و۱۱). در این مطالعه مقدار ALP بدنبال 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 سلول‌های آندوتلیال دارای اثرات ضد التهابی بسیار قوی می باشد (۵). Waseem و همکارانش گزارش نموده‌اند که گرلین سبب مهار تولید سایتوکاین های التهابی نظیر اینترلوکین (IL-1)، IL-6 و TNF-α می‌گردد (۲۰). محققین نشان دادند که دانسیته 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 اگزوژن ممکن است شرایط التهابی را بهبود دهد (۵). همچنین گزارش شده که گرلین دارای اثرات ضد التهابی در سلول های اندوتلیالی انسان بوده و تولید سایتوکاین ها توسط سلول های اندوتلیال را در پاسخ به لیپوپلی ساکارید کاهش می دهد (۹). همچنین در بیماران

www.SID.ir

Archive of SID

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 هپاتوسیتهای (سلول های پارانشیمی) کبد ندارد اما تولید آنها را در محیط کشت حاوی سلول پارانشیمی همراه با سلول های غیرپاراشیمی کاهش می دهد(۲). مصرف گرلین اگزوژن سبب مهار آزادسازی فاکتورهای التهابی ناشی از TNF-α در محیط کشت حاوی سلول های آندوتلیال ورید بندناف انسان می گردد (۱۹). از این رو تصور می گردد اثرات ضد التهابی اگونیست 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 هپاتوتوکسیسیتی 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 سلول‌های کبدی آسیب دیده و تولید (Reactive Oxygen 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 (۲۳و۹و۶). 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 (۲۵و۹و۲). 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 اگزوژن قادر است کبد را در برابر آسیب ناشی از لیپوپلی ساکارید حفاظت کند. میتوان تصور نمود که گرلین از طریق اثرات ضد التهابی، هپاتوتوکسیسیتی 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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

www.SID.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 Menduina M, Lopez Calderon A, Villanua MA. GH-releasing peptide-2 administration prevents liver inflammatory response in endotoxemia. Am J Phisiol Endocinol 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 serve sepsis. Mol Med 2009;15(11-12):407-14.
5. Ceccanti M, Attili A, Balducci G, et al. Acute alchoholic 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, Antoniades 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 dimerumic 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 Singapoor 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 Aminotransfrase (ALT) and Aspartate Aminotransfrase (AST). Technical Bulletin 2007; Number 114. Available from: http:// www.cholestech.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.

www.SID.ir

Archive of SID

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.

www.SID.ir