

**Udział ghreliny, obestatyny i kwasu glutaminowego  
oraz właściwych im receptorów w patogenezie  
choroby zaparciowej u dzieci.**

lekarz Michał Kolejwa

Klinika Gastroenterologii, Alergologii i Pediatrii

Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki



Promotor: prof. dr hab. n. med. Elżbieta Czekwianiec

Łódź, 2023

*Pani Profesor Elżbiecie Czkwianianc*  
*Składam serdeczne podziękowania*  
*za inspirację, pomoc merytoryczną i warsztatową*

*Dziękuję za pomoc i wsparcie*

*dr n. med. Ryszardowi Makosiejowi*

*oraz*

*dr hab. n. med. Renacie Stawerskiej*

## Spis treści

|  |           |
|--|-----------|
| <b>WYKAZ SKRÓTÓW .....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>WSTĘP .....</b>   | <b>8</b>  |
| EPIDEMIOLOGIA .....  | 8         |
| MECHANIZM DEFEKACJI .....  | 10        |
| <i>Faza podstawowa.....</i>  | <i>11</i> |
| <i>Faza przed wydaleniem stolca.....</i>   | <i>13</i> |
| <i>Faza wydalenia stolca .....</i>   | <i>14</i> |
| <i>Faza po defekacji .....</i>   | <i>15</i> |
| ZAPARCIE CZYNNOŚCIOWE.....   | 16        |
| ENTEROHORMONY .....  | 18        |
| GHRELINA.....  | 20        |
| OBESATYNA.....   | 24        |
| GLUTAMINIAN .....  | 28        |
| <b>ZAŁOŻENIA I CEL PRACY.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>MATERIAŁ I METODY .....</b>   | <b>34</b> |
| KOMISJA BIOETYCZNA I FINANSOWANIE .....  | 34        |
| DOBÓR GRUPY .....  | 34        |
| METODY BADAWCZE .....  | 36        |
| <i>Badanie ogólnolekarskie .....</i>   | <i>36</i> |
| <i>USG jamy brzusznej .....</i>  | <i>36</i> |
| <i>Test Hintona .....</i>  | <i>36</i> |
| <i>Badania endoskopowe .....</i>   | <i>37</i> |
| <i>Ekspresja genów dla wybranych receptorów .....</i>                                    | <i>38</i> |
| <i>Stężenia ghreliny i obestatyny .....</i>  | <i>39</i> |
| ANALIZA STATYSTYCZNA.....  | 41        |
| <b>WYNIKI.....</b>   | <b>42</b> |
| PORÓWNANIE STĘŻENIA ENTEROHORMONÓW W BADANYCH GRUPACH PACJENTÓW .....                    | 44        |
| PORÓWNANIE EKSPRESJI RECEPTORÓW (MGLU7, GHS-R, GPR39) W BADANYCH GRUPACH PACJENTÓW ..... | 46        |
| <i>Receptor glutaminianu .....</i>   | <i>46</i> |
| <i>Receptor ghreliny.....</i>  | <i>47</i> |
| <i>Receptor obestatyny.....</i>  | <i>47</i> |
| PORÓWNANIE WIELKOŚCI BAŃKI ODBYTNICY W OBU GRUPACH .....                                 | 49        |

|  |           |
|--|-----------|
| KORELACJE.....   | 49        |
| <i>Pacjenci z zaparciem stolca</i> .....   | 49        |
| <i>Grupa kontrolna</i> .....   | 51        |
| KORELACJE CZASU PASAŻU JELITOWEGO (TEST HINTONA) I ROZMIARÓW BAŃKI ODBYTNICY W USG ..... | 53        |
| KORELACJE MASY CIAŁA, WZROSTU I Z-SCORE BMI .....  | 55        |
| <b>DYSKUSJA.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>WNIOSKI .....</b>   | <b>73</b> |
| <b>STRESZCZENIE .....</b>  | <b>74</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>78</b> |
| <b>WYKAZ RYCIN I TABEL .....</b>   | <b>82</b> |
| RYSUNKI:.....  | 82        |
| TABELE: .....  | 83        |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>  | <b>84</b> |

## Wykaz skrótów

ADHD - zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi

AMN082 - N,N'-dibenzhydryletano-1,2-diamino dihydrochlorek

AMPA - receptor kwasu  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy

APUD – ang. *amine precursor uptake and decarboxylation* - komórki gromadzące i dekarboksylujące prekursorów amin katecholowych

BER – ang. *basic electric rhythm* – podstawowy rytm elektryczny

cAMP - Cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan

cDNA - komplementarny DNA

CTT – ang. *coloninc transient time* - czas pasażu przez jelito grube

DNA - Kwas deoksyrybonukleinowy

EDTA - ang. *ethylenediaminetetraacetic acid* – kwas wersenowy

EEC – ang. *enteroendocrine cells* – komórki enteroendokrynne

ENS – ang. *enteral nervous system* – układ nerwowy przewodu pokarmowego

ESPGHAN - *The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition* – Europejskie Towarzystwo Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci

GHRH - ang. *Growth Hormone Releasing Hormon* – hormon uwalniający hormon wzrostu

GHS-R - ang. *Growth Hormone Secretagogues Receptor* – receptor wydzielania hormonu wzrostu

GOAT – ang. *Ghrelin O-acetyltransferase* – O-acetylotransferaza ghreliny

GPR38 - ang. *G protein-coupled receptor 38* – sprzężony z białkiem G receptor 38

GPR39 - ang. *G protein-coupled receptor 39* – sprzężony z białkiem G receptor 39

HAPC – ang. *high amplitude propagated contractions* – skurcze propagujące o wysokiej amplitudzie

HAPS – ang. *high amplitude propagated sequences* – sekwencje propagujące o wysokiej amplitudzie

HCl – chlorowodór

IBS – ang. *irritable bowel syndrome* – zespół jelita nadwrażliwego

ICZMP – Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi

mGlu – receptor metabotropowy dla glutaminianu

MMC – ang. *motor migrating complex* – migrujący kompleks motoryczny

mRNA - ang. *messenger RNA* – matrycowy RNA

NAD(P)H - dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

NASPGHAN - North American Society For Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition  
– Północno Amerykańskie Towarzystwo Gastroenterologii Dziecięcej, Hepatologii I Żywienia

NMDA - receptor N-metylo-D-asparaginowy

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

RAIR – ang. *recto-anal inhibitory reflex* – odbytowo-odbytniczy odruch hamowania

rIGLE – ang. *rectal intraganglionic laminar endings* – laminarne wewnętrzzwojowe zakończenia nerwowe odbytu

RNA – kwas rybonukleinowy

## Wstęp

### Epidemiologia

Problem zaparcia stolca u dzieci ma znaczący wpływ zarówno na jakość życia pacjentów jak i ich rodzin. Wstrzymywanie oddania stolca i brak efektywnej defekacji wpływają na status socjologiczny, psychologiczny, jak również na wyniki w nauce [1]. Metaanaliza badań porównujących jakość życia dzieci z zaparciem stolca w porównaniu do osób zdrowych, wykazała znaczne pogorszenie samooceny jak i funkcjonowania w społeczeństwie chorych z przewlekłym zaparciem [2]. Na podstawie badań jakości życia w oparciu o kwestionariusze wykazano wpływ choroby na wszystkie aspekty takie jak ograniczenie w pełnieniu ról z powodu zdrowia fizycznego, ogólne poczucie zdrowia, funkcjonowanie społeczne, interakcje rodzinne i z rówieśnikami, poczucie zdrowia psychicznego, ogólne zadowolenie z życia, problemy szkolne. Również wyniki pozyskane z ankiet uzupełnionych przez opiekunów dzieci z chorobą zaparciową wykazały, że rodzice zaobserwowali zdecydowany wpływ choroby na kształtowanie się samooceny ich dzieci.

Innym aspektem związanym z leczeniem choroby zaparciowej są ponoszone koszty. W Stanach Zjednoczonych w latach 2006-2011 zaobserwowano znaczny wzrost częstości zgłaszania się pacjentów do szpitala z powodu dolegliwości związanych z zaparciem stolca. Jednocześnie zanotowano wzrost kosztów takiej hospitalizacji z \$1,474 w 2006 roku do \$2,306 w 2011 roku, co w 2011 roku dało sumę \$1,622,624,341 [3].

Zaparcie jest jednym z najczystszych problemów gastroenterologicznych z którymi spotykają się pediatrzy na całym świecie. Szacuje się, że dotyczy nawet 37% dzieci [4–6]. 95%



przyczyn zaparcia stolca to zaburzenia czynnościowe przewodu pokarmowego, a tylko 5% ma uwarunkowania organiczne. Zaparcie u dzieci pojawia się często podczas tzw. treningu korzystania z toalety, czyli pomiędzy 2. a 4. rokiem życia i dotyczy głównie chłopców [7]. Czynnościowe zaparcie stolca rozpoznaje się na podstawie Kryteriów Rzymskich. W 2006 roku wydano III wersję dokumentu, który ściśle określa ramy niezbędne do rozpoznania choroby. W maju 2016 roku wprowadzono IV wersję dokumentu, która wyraźnie rozgranicza dzieci z zaparciem na dwie grupy: te dzieci, które potrafią samodzielnie korzystać z toalety oraz te, które jeszcze nie nabyły tej umiejętności. Główną przyczyną takiego podziału jest to, że w okresie przed uzyskaniem umiejętności kontrolowania samodzielnego wypróżniania się trudno jest ocenić nietrzymanie stolca oraz ocenić wielkość stolca jako „zatykający toaletę”. Ponadto u starszych dzieci z obawy przed niepotrzebnym opóźnieniem wdrożenia leczenia skrócono czas niezbędny do rozpoznania zaburzenia z 2 do 1 miesiąca [8].

W tej pracy rozpoznawano zaparcie stolca na podstawie kryteriów Rzymskich III z uwagi na ich obowiązywanie w okresie rozpoczęcia rekrutacji pacjentów do oceny udziału enterohormonów w patogenezie choroby zaparciowej u dzieci.

Według obowiązujących zaleceń ESPGHAN i NASPGHAN odpowiednie preparaty glikolu polietylenowego są preparatami zalecanymi do leczenia zaparcia stolca u dzieci [9]. Są bezpieczne, ich skuteczność znacząco przewyższa preparaty zawierające laktulozę, preparaty magnezowe, parafinę czy placebo. Udowodniono, że ok. 50% dzieci leczonych z powodu zaparcia czynnościowego doświadczyło przynajmniej jednego epizodu nawrotu choroby w ciągu 5 lat od zakończenia leczenia [10]. Stąd wynika potrzeba wyjaśniania mechanizmów powstawania czynnościowego zaparcia, jak i poszukiwania nowych punktów uchwytu dla potencjalnych leków skutecznych w terapii choroby zaparciowej.

## Mechanizm defekacji

Za ruchy perystaltyczne przewodu pokarmowego odpowiadają mięśnie gładkie, neurony jelitowe, komórki śródmiąższowe przewodu pokarmowego, w tym telocyty i komórki Cajala. Heterogenne komórki, pochodzenia mezenchymalnego – komórki Cajala, rozmieszczone w warstwie mięśniowej przewodu pokarmowego charakteryzują się zmiennym potencjałem błonowym, przez co wykazują cechę komórek rozrusznikowych w przewodzie pokarmowym. Przez połączenia szczelinowe (ang. *gap junctions*) z innymi komórkami przewodu pokarmowego, głównie z komórkami mięśniowymi i nerwowymi pełnią one funkcję regulatorową motoryki przewodu pokarmowego [11, 12]. Podstawowy rytm bioelektryczny (*BER - ang. basic electric rythm*) rozpoczyna się w warstwie podłużnej miocytów przewodu pokarmowego, a następnie jest przenoszony na warstwę okrężną. Zjawisko to podlega stałej modulacji enterohormonalnej. W okresie spoczynkowym czynność elektryczna i skurczowa przewodu pokarmowego jest ograniczona do minimum. Wówczas dochodzi do wywołania tzw. międzytrawiennych kompleksów mioelektrycznych (*MMC – ang. migrating motor complex*) [13]. MMC rozpoczyna swoją aktywność ok 90 min po posiłku i dzieli się go na 4 fazy trwające 90-180min:

- faza I – okres spoczynku
- faza II - składa się z przerywanych skurczów o niskiej amplitudzie
- faza III – składa się z krótkich serii regularnych skurczów o wysokiej amplitudzie
- faza IV – jest to okres przejściowy do fazy pierwszej

Zadaniem tego kompleksu jest przesuwanie treści pokarmowej w kierunku dystalnym jelita.

Pod wpływem posiłku MMC jest wyciszany na rzeczy motoryki trawiennej.

Akt wypróżnienia jest nierozdzielnie powiązany z warunkami anatomicznymi, sprawnym działaniem i komunikacją z ośrodkowym układem nerwowym (OUN) oraz układem endokrynnym [14]. Na jakość wypróżnień ma wpływ wiele czynników, począwszy od czynników psychobehawioralnych, przyjmowanie odpowiedniej pozycji w trakcie defekacji, przez dietę, wiek, płeć, choroby towarzyszące oraz czynniki metaboliczne.

Mechanizm defekacji można podzielić na cztery fazy:

- fazę podstawową
- fazę przed defekacją
- fazę wydalenia stolca
- fazę po defekacji

#### Faza podstawowa

Jest to czas regularnego funkcjonowania jelita grubego. Funkcje okrężnicy związane z prawidłowym wypróżnianiem obejmują: wchłanianie wody z treści jelita, wyrzut zawartości okrężnicy w odpowiednim tempie oraz tymczasowa retencja mas kałowych do wystąpienia dogodnego czasu i warunków do ich wydalenia. Po dostarczeniu treści pokarmowej z końcowego odcinka jelita krętego do kątnicy, podczas transportu w kierunku dystalnym, następuje stopniowe osuszanie i mieszanie, przez co masy kałowe stają się coraz bardziej gęste i uformowane [15].

Motoryka okrężnicy wykazuje cechy zmienności dobowej. Rano, po przebudzeniu, obserwowany jest znaczny wzrost aktywności motorycznej, natomiast w nocy zauważalna jest tendencja do spowolnienia [16]. Ponadto, wzmożona aktywność występuje również po posiłkach.

Aktywność ruchowa okrężnicy charakteryzuje się krótkimi skurczami – tzw. fazowymi, a także dłużej utrzymującymi się skurczami tonicznymi [17]. Skurcze fazowe są dalej klasyfikowane jako skurcze propagujące lub niepropagujące, w zależności od tego, czy postępują wzdłuż okrężnicy. Częściej występują skurcze niepropagujące. Mogą one występować jako pojedyncze, pozornie losowe skurcze lub serie skurczów [15]. Mają one częstotliwość od 2 do 4 cykli na minutę [18] i amplitudę od 5 do 50 mmHg [19]. Ze względu na czas trwania tych skurczów dzieli się je na krótkie tj. poniżej 15 s oraz długie trwające 15-60 s [15]. Skurcze propagujące z kolei dzieli się na wsteczne (rzadziej występujące) i postępujące [19]. Skurcze wsteczne są znacznie częściej obserwowane u osób z zaparciem stolca [20].

W esicy stwierdza się przede wszystkim cykliczne skurcze MMC, które odgrywają rolę w modulowaniu transportu mas kałowych do odbytnicy. Kompleksy motoryczne mają amplitudy rzędu 15–60 mm Hg, trwają 3–30 min i nawracają w odstępach 80–90 min [19, 21].

Wśród sekwencji propagujących występują zestawy rozchodzących się fal ciśnienia o podwyższonej amplitudzie. Fale te zostały nazwane sekwencjami propagującymi o dużej amplitudzie (*HAPS – ang. high amplitude propagated sequences*, lub *HAPC – ang. high amplitude propagated contractions*) [15], zazwyczaj osiągają one amplitudy ok. 100 mmHg [22]. U dorosłych HAPC występują średnio 5–6 razy dziennie (zakres 2–24), natomiast u dzieci poniżej 4 roku życia częstość występowania HAPC jest istotnie większa [23].

Podobnie jak w esicy, charakterystyczne dla aktywności motorycznej odbytnicy jest występowanie kompleksów motorycznych [19].

W czasie pomiędzy defekacjami kanał odbytu pozostaje zamknięty, wynika to ze stale utrzymującej się tonicznej aktywności zwieraczy wewnętrznego i zewnętrznego odbytu. Taki stan zapobiega nietrzymaniu stolca oraz stanowi naturalną barierę oddzielającą dolny odcinek

przewodu pokarmowego od świata zewnętrznego. Największe znaczenie w zapobieganiu bezwiednego wydalania stolca ma zwieracz wewnętrzny (ok. 55%), następnie zwieracz zewnętrzny (ok. 30%); pozostałe 15% napięcia jest wytwarzane przez swego rodzaju poduszki naczyniowe składające się ze splotów naczyń żylnych [24]. Okresowo następuje chwilowe rozluźnianie zwieracza wewnętrznego, aby część treści jelitowej dostała się do górnej części kanału odbytu, gdzie znajdują się liczne receptory odpowiedzialne za percepcję właściwości fizycznych treści jelitowej. Taka sygnalizacja, służąca ocenie treści jelitowej, występuje ok. 7 razy w ciągu godziny [25]. Odruch chwilowego rozluźnienia zwieracza wewnętrznego można wywołać w trakcie badania manometrycznego w czasie napełniania balonu – po wypełnieniu balonu dochodzi do odruchowego rozluźnienia zwieracza wewnętrznego odbytu oraz skurczu zwieracza zewnętrznego (*RAIR – ang. recto-anal inhibitory reflex*) [14].

#### Faza przed wydalaniem stolca

W trakcie tej fazy dochodzi do uświadomienia potrzeby defekacji. U osób zdrowych istnieje ścisły związek między amplitudą fal propagujących a potrzebą wydalenia mas kałowych. Takiej zależności w wielu przypadkach nie obserwuje się u pacjentów z zaparciem stolca [26]. Miejscem, które wyzwala uczucie parcia na stolec są ściany odbytnicy i rozmieszczone w niej receptory. Stopniowe rozszerzanie odbytnicy masami kałowymi powoduje reakcję czuciową, rozpoczynającą się od początkowej świadomości wypełnienia odbytnicy, aż do uczucia dyskomfortu. Osiągnięcie maksymalnej objętości prowadzi do intensywnego poczucia konieczności defekacji [27, 28]. U osób z retencyjnym zaparciem stolca, które tłumią uczucie parcia, dochodzi do osłabienia podatności wypełnionej bańki

odbytnicy, co skutkuje zatrzymaniem mas kałowych i wtórnym poszerzeniem bańki odbytnicy [29].

W mięśniówce odbytnicy znajdują się wyspecjalizowane zakończenia nerwowe z rozgałęzionymi i spłaszczonymi zakończeniami blaszkowatymi, zwane odbytniczymi wewnątrz-zwojowymi zakończeniami laminarnymi (*rIGLE* - *ang. rectal intraganglionic laminar endings*). Ich rolą jest przekazywanie informacji z niskoprogowych mechanoreceptorów, wrażliwych na rozciąganie do ośrodkowego układu nerwowego. Gęstość rozmieszczenia mechanoreceptorów zmniejsza się znacznie proksymalnie od odbytu, wzdłuż dystalnego odcinka jelita [30]. Wykazano, że niskie znieczulenie podpajęczynówkowe (L5–S1) znosi czucie odbytnicze, które przy większym wypełnieniu bańki odbytnicy jest postrzegane jako dyskomfort w jamie brzusznej, co świadczy o istotności udziału włókien aferentnych z tego obszaru w uczuciu pełności bańki odbytnicy [31].

#### Faza wydalenia stolca

W trakcie defekacji dochodzi do opróżnienia odbytnicy. W celu usunięcia zawartości odbytnicy, ciśnienie wewnątrzodbytnicze musi przekraczać ciśnienie w kanale odbytu. Prawidłowe wypróżnianie wiąże się zatem ze wzrostem ciśnienia wewnątrzodbytniczego oraz konieczną relaksacją kanału odbytu, co skutkuje zmniejszeniem ciśnienia w odbycie. Naprężenie mięśni podczas ewakuacji stolca podnosi ciśnienie w miednicy, a tym samym w odbytnicy. U zdrowych osób 35–40% wszystkich fal propagujących o wysokiej amplitudzie (HAPS) w ciągu dnia występuje w trakcie lub bezpośrednio przed defekacją [15].

Rozluźnienie zwieracza wewnętrznego odbytu następuje mimowolnie w odpowiedzi na rozszerzenie odbytnicy. Po przyjęciu pozycji dogodnej do defekacji, napinane są mięśnie

brzucha i przepona przy zamkniętej głośni (jak w próbie Valsalvy). Wiąże się to z rozluźnieniem zewnętrznego zwieracza odbytu. Wypadkowy wektor siły skierowany jest do tyłu i do dołu, co powoduje otwarcie kąta anorektalnego. Ułatwia to skurcz mięśnia tonowo-guzicznego, który „usztynia” krocze, skutecznie napinając przednią ścianę kanału odbytu, umożliwiając jedynie ruch tylnej ściany kanału odbytu [32]. Skurcz połączonych podłużnych mięśni odbytu powoduje również spłaszczenie poduszek naczyniowych odbytu i skrócenie kanału odbytu. Wszystkie te zmiany, zachodzące jednocześnie, obniżają ciśnienie w kanale odbytu do wartości niższej niż ciśnienie wewnątrzodbytnicze, powodując gradient ciśnienia z odbytnicy na zewnątrz, co skutkuje wydalaniem mas kałowych.

#### Faza po defekacji

W tej fazie dochodzi do mimowolnego skurczu zwieracza zewnętrznego odbytu oraz mięśni dna miednicy co doprowadza do zamknięcia odbytu. Zwieracz zewnętrzny wykazuje chwilowe zwiększenie aktywności – tzw. odruch zamykający, co pozwala na swobodny skurcz zwieracza wewnętrznego, który nie jest już hamowany przez rozdęcie odbytnicy. Po ustaniu wysiłku i spadku ciśnienia w jamie brzusznej dochodzi do skurczu mięśnia tonowo-odbytniczego, co zwiększa jego przyczepność do połączenia anorektalnego, przywracając kąt do stanu podstawowego, następuje również bierne rozciągnięcie poduszek odbytu, co powoduje całkowite zamknięcie kanału odbytu [14].

## Zaparcie czynnościowe

Aby rozpoznać czynnościowe zaparcie stolca wg wspomnianych wcześniej Kryteriów Rzymskich III muszą zostać spełnione co najmniej 2 z niżej wymienionych warunków u dziecka w wieku przynajmniej 4 lat, nie spełniając przy tym jednocześnie kryteriów zespołu jelita drażliwego (*IBS – ang. irritable bowel syndrome*):

- 1) dwa lub mniej wypróżnień w toalecie w tygodniu,
- 2) przynajmniej jeden epizod popuszczania stolca w tygodniu,
- 3) w wywiadzie postawa retencyjna lub świadome unikanie defekacji,
- 4) w wywiadzie bolesne wypróżnienia lub oddawane twarde stolce,
- 5) obecność obfitych mas kałowych w odbytnicy,
- 6) w wywiadzie duża średnica stolca, który „zatyka” toaletę [7].

Najczęstszą przyczyną występowania zaparcia u dzieci są zaburzenia czynnościowe przewodu pokarmowego, jednak istnieje pewna grupa czynników ryzyka sprzyjających wystąpieniu tych zaburzeń. Najważniejszym czynnikiem wydaje się być dieta uboga w błonnik. Badania oceniające spożycie błonnika w diecie i jego wpływ na rytm i jakość wypróżnień jasno wykazały, że u dzieci, u których stosowano dietę bogatą w błonnik obserwowano znacznie mniej częste występowanie zaparcia stolca [33].

W kilku innych badaniach opisano wpływ czynników psychologicznych na częstość występowania zaparcia u dzieci [34–38]. Kim J. i wsp. wykazali znaczący wpływ zaburzeń psychicznych pod postacią lęku, depresji, odporności na stres czy występowanie myśli samobójczych na rytm i rodzaj wypróżnień u dzieci [39]. Inni badacze wykazali wpływ stresu w szkole jak i poza nią na występowanie zaparcia u dzieci, co skutecznie potwierdza ważny



udział osi mózgowo-jelitowej w patogenezie czynnościowych zaburzeń przewodu pokarmowego.

Zaparcie stolca, zwłaszcza występujące u małych dzieci, może być objawem alergii na białka mleka krowiego. W kilku badaniach potwierdzono, że tego typu nieprawidłowości w oddawaniu stolca mogą być manifestacją alergii [40].

Innymi czynnikami ryzyka predysponującymi do wystąpienia zaparcia mogą być: niska masa urodzeniowa, pozytywne wywiady rodzinne w kierunku zaparcia stolca oraz zamieszkiwanie w rozwiniętej, zurbanizowanej społeczności.

Ponad 95% zaparcia stolca stanowią zaburzenia czynnościowe, pozostałe 5% jest związane z występowaniem:

- chorób jelit: choroba Hirschsprunga, inne agangliozy błony śluzowej przewodu pokarmowego, wrodzone i nabyte nieprawidłowości anatomiczne anorektalne (m.in. zarośnięcie odbytu), dysplazja komórek nerwowych w zakresie przewodu pokarmowego
- przyczyn metabolicznych: niedoczynność tarczycy, cukrzyca, hiperkalcemia, hipokaliemia, zatrucie witaminą D
- stosowania leków: opioidy, leki antycholinergiczne, leki przeciwdepresyjne
- inne: anoreksja, nadużycia seksualne, twardzina, mukowiscydoza

Borowitz i wsp. w 2003 roku opisali teorię „bolesnego” wypróżnienia jako główną przyczynę czynnościowego zaparcia stolca [41]. Wg tej teorii po incydencie bolesnego wypróżnienia dziecko świadomie zaczyna powstrzymywać akt defekacji. W trakcie wstrzymywania oddania stolca w błonie śluzowej odbytnicy dochodzi do wchłaniania wody z mas kałowych, które przez to stają się twarde. W związku z tym, dziecko zaczyna przyjmować

postawę retencyjną próbując uniknąć bolesnego oddania stolca. Gdy dojdzie do oddania stolca, czasem z pęknięciem śluzówki odbytu, dziecko podtrzymuje swoje założenia, że defekacja jest nieprzyjemna. Poprzez utrwalenie tego schematu dochodzi do rozciągania ścian jelita grubego, a próg odczuwania obecności stolca w bańce odbytnicy ulega zwiększeniu. W ten sposób powstaje błędne koło prowadzące do długotrwałego zaparcia stolca.

### Enterohormony

Enterohormony zostały pierwszy raz opisane na początku XX wieku, kiedy to w 1903 roku Bayliss i Starling wykazali, że ekstrakty z jelit psa podane innemu zwierzęciu stymulują wydzielanie soku trzustkowego – przypuszczając, że ekstrakt zawiera sekretną substancję, nadali jej nazwę „sekretyna” [42]. Dzięki rozwojowi metod immunohistochemicznych oraz genetycznych w latach '60 XX wieku odkryto, że komórki endokryne zlokalizowane w przewodzie pokarmowym wykazują cechy wspólne dla komórek układu nerwowego. Dalsze obserwacje przyczyniły się do rozwinięcia teorii komórek „APUD” (*APUD – ang. Amine Precursor Uptake and Decarboxylation*) [43].

Biorąc pod uwagę liczbę komórek, największa część układu endokrynnego jest zlokalizowana w przewodzie pokarmowym, gdzie komórki czynne endokrynologicznie stanowią ok. 1% komórek nabłonka [44–46]. Komórki endokryne zlokalizowane w przewodzie pokarmowym (*EEC – ang. enteroendocrine cells*) są wyspecjalizowane w wytwarzaniu oraz uwalnianiu enterohormonów o działaniu miejscowym jak i ogólnoustrojowym, natomiast rola enterohormonów i ich receptorów w zaparciu stolca jak dotąd nie była jednoznacznie określona.

Komórki enteroendokryne wyspecjalizowały się z pluripotencjalnych komórek endodermy [42]. Komórki te pod względem budowy podzielono na dwa typy: „otwarte” – w kształcie szyjki butelki z wydłużeniem z mikrokosmkami skierowanymi w kierunku światła przewodu pokarmowego oraz „zamknięte”, które są zlokalizowane bliżej błony podstawnej, nie dosięgają one do światła przewodu pokarmowego i są pozbawione mikrokosmków [42]. Komórki typu otwartego posiadają łączność ze światłem żołądka, przez co ich funkcje są regulowane przez zawartość treści pokarmowej oraz pH wewnątrz żołądka. Komórki zamknięte, nie posiadają łączności ze światłem narządu, przez co ich funkcje są regulowane parakrynnie, endokrynnie oraz przez bodźce mechaniczne – np. przez rozciąganie ścian żołądka [47, 48]. Obydwa typy komórek gromadzą produkowane cząsteczki w cytoplazmatycznych granulkach, a po zadziałaniu odpowiedniego bodźca mechanicznego, biochemicznego lub nerwowego uwalniają je przez egzocytozę do błony podstawnej. Substancje wydostające się w ten sposób z komórek działają lokalnie, na pozostające w pobliżu zakończenia nerwowe lub poprzez dostanie się do krwioobiegu wpływają na inne receptory w organizmie. Dotychczas opisano ponad 20 różnych cząsteczek produkowanych przez komórki endokryne, które są zlokalizowane w przewodzie pokarmowym. Zazwyczaj pojedyncze komórki produkują więcej niż jeden rodzaj cząsteczek, natomiast nie są do końca znane procesy, które indukują odpowiednie różnicowanie się EEC [48].

EEC są komórkami odpowiadającymi na różnorodne substancje i mikroorganizmy obecne w świetle przewodu pokarmowego, tym samym są często pierwszą linią komórek aktywujących neurony, przekazują informacje do różnych obszarów w ośrodkowym układzie nerwowym. Sensoryczna funkcja tych komórek aktywuje różnorodne funkcje: indukuje proces trawienia oraz przyswajania, jak również bierze udział w obronie organizmu przed różnymi toksynami poprzez uruchamianie odruchów obronnych takich jak np. wymioty czy biegunka.

EEC w odpowiedzi na bodziec pokarmowy uwalniają enterohormony, których zadaniem jest obkurczenie pęcherzyka żółciowego, wydzielenie soku trzustkowego oraz odpowiednia modyfikacja motoryki przewodu pokarmowego. Znane są również inne fizjologiczne funkcje EEC, takie jak wspomaganie wzrostu i naprawa nabłonka, przez co wpływają na wzmocnienie bariery jelitowej. Całokształt ich funkcji znacząco wpływa na działanie osi mózgowo-jelitowej, dzięki której mózg stale otrzymuje dopływ informacji z przewodu pokarmowego. Przekaz ten odbywa się poprzez nerwy błędne, aferentne włókna nerwowe rdzenia kręgowego, immunomediatory, produkty mikrobioty oraz enterohormony [49].

Dotychczas w literaturze pojawiały się badania dotyczące roli enterohormonów w patogenezie zaparcia stolca, zdecydowana większość z tych badań była przeprowadzona na modelu zwierzęcym lub dotyczyła populacji osób dorosłych [50, 51]. Nie przeprowadzono dotychczas badań wyjaśniających relacje enterohormonów z patogenezą czynnościowego zaparcia stolca u dzieci.

## Ghrelina

W latach '70 i '80 XX wieku opisano syntetyczne czynniki stymulujące wydzielanie hormonu wzrostu na poziomie podwzgórza i przysadki. Ich budowa nie przypominała struktury GHRH (*GHRH - ang. Growth Hormone Releasing Hormon*) a receptor, przez który oddziaływały nazwano GHS-R (*GHS-R - ang. Growth Hormone Secretagogues Receptor*). W 1999 roku z komórek żołądka szczura wyizolowano nieznanego dotąd endogennego liganda dla GHS-R. Ligand ten nazwano ghreliną (ang. ghrelin od słów „ghre” – proto-indo-europejskiego protoplasty słowa „growth” – wzrost oraz „relin” od „releasing” – wydzielający) [52–54].

Ghrelina jest 28-aminokwasowym peptydem syntetyzowanym przez komórki P/D1 i X/A-podobne w błonie śluzowej żołądka oraz w podwzgórzcu [55, 56]. Częsteczka ghreliny wstępnie jest syntetyzowana jako 117 aminokwasowy prohormon - preproghrelina, a następnie jest poddawana dalszej obróbce w aparacie Golgiego. Genem dla preproghreliny jest *GHRL* znajdujący się na trzecim chromosomie w regionie 3p25-26. Gen ten składa się z 5 eksonów oraz 4 intronów. Po proteolizie z cząsteczki preproghreliny powstaje 23-aminokwasowa cząsteczka sygnałowa oraz 94-aminokwasowa proghrelina. Kolejny etap obróbki posttranslacyjnej polega na działaniu O-acetylotransferazy ghreliny (*GOAT* – ang. *Ghrelin O-acetyltransferase*), która przyłącza grupę oktanylową do seryny w pozycji trzeciej łańcucha peptydowego. Ostatecznym etapem jest działanie proteazy PC1/3 w pozycji Arg28/Ala29 w wyniku czego dochodzi do powstania biologicznie czynnej ghreliny złożonej z 28-aminokwasów [53, 57].

W zależności od związania grupy acylowej z seryną, która znajduje się na trzecim miejscu łańcucha peptydowego rozróżnia się dwie aktywne biologicznie formy ghreliny: acylowaną i nieacylowaną. Forma acylowa wykazuje działanie endokrynne, natomiast forma nieacylowana wpływa głównie na układ krążenia oraz na regulację proliferacji komórek [57,58].

U osób dorosłych obserwuje się wyraźny wzrost stężenia acylowanej ghreliny w surowicy krwi przed posiłkiem a następnie po posiłkowy spadek stężenia. Natomiast u dzieci to zjawisko spadku stężenia ghreliny jest znacznie mniej zaznaczone, co sprzyja dodatniemu bilansowi energetycznemu oraz pozytywnie wpływa na wzrastanie [59].

Ghrelina jest najsilniejszym agonistą dla receptora uwalniającego hormon wzrostu [56,60]. Ten receptor należy do rodziny receptorów powiązanych z białkiem G. Jego gen

znajduje się na długim ramieniu chromosomu 3 w regionie 3q26.2. GHS-R występuje w organizmie w dwóch formach: GHS-R1a – zbudowanego z pojedynczego polipeptydu o strukturze  $\alpha$ -helikalnej składającej się na 7 przezbłonowych domen oraz GHS-R1b, który składa się tylko na 5 przezbłonowych domen [54]. Rola receptora GHS-R1b wciąż pozostaje niejasna, nie zaobserwowano, aby wiązał on cząsteczkę ghreliny lub w jakikolwiek sposób na nią odpowiadał. Uważa się, że może on modulować aktywność receptora GHS-R1a [61, 62].

Natomiast, gdy dochodzi do aktywacji receptora 1a przez ghrelinę, prowadzi to do zmiany konformacji białka G, co następnie aktywuje fosolipazę-C lub zostaje uruchomiony szlak kinazy proteinowej A/cAMP. Aktywacja ścieżki kinazy proteinowej prowadzi do uwolnienia jonów wapniowych z siateczki endoplazmatycznej, zwłaszcza w komórkach zawierających neuropeptyd Y [54]. U szczurów, za pośrednictwem tej ścieżki, zaobserwowano nasilenie motoryki przewodu pokarmowego [62].

W związku z tym, że duża część komórek syntetyzujących ghrelinę znajduje się w żołądku, zwróciło to uwagę badaczy na jej rolę w regulacji motoryki przewodu pokarmowego, a zwłaszcza żołądka. Wyniki przeprowadzanych badań wskazują na złożony wpływ regulujący ghreliny na sekrecję kwasu solnego. Natomiast w badaniach przeprowadzonych *in vitro* nie zaobserwowano, aby podanie ghreliny na wyizolowane komórki D, G i ECL z błony śluzowej żołądka powodowało zmniejszoną bądź zwiększoną sekrecję kwasu solnego. Inne badania natomiast wykazały pobudzający wpływ ghreliny podanej dożylnie [63] i dootrzewnowo na sekrecję HCl [64].

Szeroko badanym efektem działa ghreliny jest jej protekcyjny wpływ na błonę śluzową żołądka. Wykazano, że ghrelina pochodzenia egzogenne w zależności od dawki łagodzi ostre uszkodzenia błony śluzowej żołądka wywołane takimi czynnikami jak etanol [65] czy stres [66].

Działanie ochronne ghreliny na błonę śluzową żołądka jest opisywane jako efekt zwiększenia przepływu krwi w naczyniach krwionośnych żołądka, co skutkuje efektem troficznym, a dodatkowo wspomaga działania komórek układu immunologicznego [67].

Ghrelina wykazuje duże podobieństwo w budowie cząsteczki do motyliny, szczególnie w zakresie budowy receptorów dla obydwu enterohormonów. Z tego powodu stała się przedmiotem badań nad jej wpływem na motorykę przewodu pokarmowego. W toku badań wykazano, że ghrelina skutecznie pobudza kompleks motoryczny jelita oraz przyspiesza opróżnianie żołądka [68, 69]. Dzieje się tak za pomocą aktywacji aferentnych włókien nerwu błędnego [70]. Podanie ghreliny dożylnie bądź dokomorowo u szczurów, w trakcie karmienia, indukuje powstanie głodowego wzorca cyklu, ponadto dożylny wlew ghreliny na czczo wywołuje przedwczesną III fazę MMC rozpoczynającą się w żołądku [71]. Natomiast u myszy pozbawionych genu dla ghreliny obserwowane jest prawidłowe MMC, co sugeruje, że ghrelina nie jest głównym regulatorem motoryki przewodu pokarmowego [70]. Pomimo, że ghrelina i jej receptory były dość dokładnie opisane w opróżnianiu żołądka, wciąż nie została określona jej rola w etiopatogenezie zaparcia stolca, zwłaszcza u dzieci [72].

Dodatkowo ghrelina pełni wiele innych funkcji w organizmie:

- reguluje wydzielanie hormonu wzrostu
- uczestniczy w przemianie tkanki tłuszczowej
- bierze udział w metabolizmie glukozy oraz wydzielaniu insuliny
- reguluje przyjmowanie pokarmu [55, 69]

## Obestatyna

Obestatyna jest odkrytym w 2005 roku peptydem, zbudowanym z 23 aminokwasów jako rezultat postprodukcji opisanej wcześniej cząsteczki preproghreliny. Jej nazwa pochodzi od połączenia dwóch łacińskich słów: „obedere” – pożerać i „statin” – hamować co obrazuje pierwsze opisane funkcję enterohormonu. Aktywność obestatyny jest przeciwna do działania ghreliny – zmniejsza chęć przyjmowania pokarmu, opóźnia opróżnianie żołądka oraz spontaniczną aktywność izolowanych części jelita cienkiego [54]. Pierwotnie opisywano, że gen *GHRL*, zlokalizowany na krótkim ramieniu trzeciego chromosomu, jest prekursorem dla zbudowanej ze 117 aminokwasów cząsteczki preproghreliny. Natomiast Seim i wsp. wykazali, że oprócz czterech eksonów produkujących preproghreliny, gen może zawierać także dwa dodatkowe eksony początkowe (-1 i 0) oraz rozszerzony ekson 1. Ponadto istnieją również różne wersje splicingowe prekursorowego mRNA. Wyindukowana u ludzi delecja eksonu 3 w pre-mRNA dla preproghreliny skutkuje powstaniem matrycy kodującej prawidłową cząsteczkę ghreliny oraz C-końcowy peptyd składający się z 16 aminokwasów, nie stwierdzono natomiast aby w tym wypadku kodowana była cząsteczka obestatyny. Z drugiej strony delecja eksonów 1 i/lub 2 skutkuje wytworzeniem prekursorowego mRNA jedynie dla cząsteczki obestatyny [73].

Receptor dla obestatyny wciąż pozostaje nieznanym. Przypuszcza się, że jest nim prawdopodobnie receptor 39 powiązany z białkiem G (*GPR39* - ang. *G protein-coupled receptor 39*) lub glukagonopodobny receptor 1 (ang. *Glucagon-like peptide 1 receptor*) [74]. W 2005 r. Zhang i wsp. postawili hipotezę, według której ligandem dla GPR39 jest obestatyna. W badaniu przeprowadzonym na komórkach jajnika chomika chińskiego wykazali,



że znakowana <sup>125</sup>I obestatyna z wysokim powinowactwem oddziałuje z sierocym receptorem GPR39 [75].

Receptor GPR39 należy do rodziny tzw. receptorów rodopsynopodobnych, do której również należy opisany wcześniej GHS-R oraz receptor dla motyliny (GPR38). Masa molekularna receptora ludzkiego wynosi 52kDa.

Ponadto największą ekspresję genów receptora stwierdzono w błonie śluzowej żołądka oraz jelit, jak również w tkance tłuszczowej, wątrobie, śledzionie, tarczycy, płucach, sercu, tkankach układu rozrodczego jak i w niektórych regionach mózgu [76].

Receptory GPR39 biorą udział w regulowaniu wielu mechanizmów w celu utrzymania homeostazy, opisano ich wpływ na przyjmowanie pokarmów, motorykę żołądka oraz śmierć komórek [76].

W celu bliższego poznania funkcji receptora wyhodowano myszy pozbawione *GPR39*. Na tym modelu Tremblay i wsp. stwierdzili, że masa ciała, otyłość i spożycie pokarmu były podobne zarówno u osobników posiadających obie kopie genu jak i u tych pozbawionych obu kopii [77]. Dodatkowo stwierdzili, że poziomy glukozy i insuliny na czczo są podobne w przypadku obu genotypów. Moechars i wsp. w swoich badaniach skupili się na funkcjach żołądkowo-jelitowych GPR39 [78]. Wyniki przez nich uzyskane dowiodły, że opróżnianie żołądka, pasaż przewodu pokarmowego oraz stężenia cholesterolu i objętość wydzielonego soku żołądkowego uległy znacznemu zwiększeniu, ale wydzielanie kwasu żołądkowego pozostało niezmienione po 4-godzinnym podwiązaniu odźwiernika u myszy pozbawionych genu *GPR39*. Ponadto u myszy pozbawionych genu dochodziło do szybszego oddawania stolca niż w grupie kontrolnej [78].

Natomiast Dittmer i wsp [79]. stwierdzili, że linia komórkowa z nadekspresją *GPR39* w hipokampie była odporna na różne stymulatory śmierci komórkowej i chroniła przed

stressem oksydacyjnym. Wynik ten sugeruje, że GPR39 może być nowym inhibitorem śmierci komórki.

Szlak działania receptora odbywa się za pośrednictwem białka G, czyli białka adaptorowego dla receptora metabotropowego, czego następstwem jest zwiększona produkcja cAMP [80, 81]. Receptory związane z białkiem G stanowią najliczniejszą i bardzo zróżnicowaną grupę białek błonowych odpowiedzialnych za przekazywanie sygnałów przez dwuwarstwą lipidową do miejsc efektorowych znajdujących się we wnętrzu komórki [82].

GPR39 razem z receptorem GPR38 po raz pierwszy wyizolowano oraz opisano w 1997 roku. Receptory wykazywały bardzo duże podobieństwo w budowie do GHS-R [83]. Obecność GPR39 opisano w podwzgórz, przysadce mózgowej, żołądku, jelicie cienkim, jelicie grubym, trzustce, płucach, w mięśniu sercowym oraz w tkance tłuszczowej.

Gen dla GPR39 znajduje się na chromosomie 2 w pozycji q21.2, a jego wielkość jest oceniana na 230kb. Składa się on z dwóch eksonów oddzielonych od siebie intronem o długości 200kb [82].

Przeprowadzone analizy PCR, udowodniły, że GPR39 wykazuje dwie izoformy: GPR39-1a – biologicznie aktywny, zawierający 7 przezbłonowych domen, GPR39-1b – biologicznie nieaktywny, składający się z 5 przezbłonowych domen [54, 84]. Uważa się, że poprzez tworzenie heterodimerów GHS-R1a/GHS-R1b receptor 39 może wywierać negatywny wpływ na receptor dla ghreliny.

Pierwsze opisy działania cząsteczki obestatyny jednomyślnie wskazywały na opozycyjne działanie w stosunku do cząsteczki ghreliny, tj. opóźnienie opróżniania żołądka, zmniejszenie przyjmowania pokarmów oraz obniżenie przyrostu masy ciała [81]. Wynik badań

przeprowadzonych na zwierzętach nie wykazały jednoznacznego działania obestatyny pod postacią obniżenia masy ciała. Istnieją prace potwierdzające tą tezę, ale wyniki innych badań nie wykazują jakiegokolwiek wpływu na masę ciała. Ataka K. i wsp. poprzez analizę aktywności motorycznej oraz pomiar czasu potrzebnego do inicjacji 3 fazy ruchów perystaltycznych żołądka i dwunastnicy, u szczurów zarówno głodzonych jak i karmionych, wykazali hamujący wpływ obestatyny na motorykę przewodu pokarmowego [85]. W badaniu tym poprzez dożylne podawanie obestatyny udało się uzyskać hamujący wpływ obestatyny po 30-90 min od podania. W dalszej części badania udowodniono, że działanie tego enterohormonu na przewód pokarmowy odbywa się również poprzez aferentne włókna nerwu błędnego, jednak jest to działanie częściowe a nie całkowite, co pośrednio tłumaczy obecność receptorów dla obestatyny w jelicie.

W literaturze można spotkać również opisy udziału obestatyny w metabolizmie glukozy. Natomiast dalej pozostaje niejasne jaki wywiera wpływ na wydzielanie insuliny. Wykazano bowiem zarówno jej hamujący jak i pobudzający wpływ, ponadto dostępne są również wyniki badań, w których nie stwierdzono jakiegokolwiek wpływu na wydzielanie insuliny [86].

Zespół Aydin i wsp. wykazał, że obestatyna, podobnie do leptyny, jest obecna w mleku kobiet, a jej stężenie znacząco przewyższa stężenie mierzone w surowicy [87]. Te wyniki przyczyniły się do przypuszczeń, że hormon ten jest także produkowany w gruczołach mlekowych.

Wiele badań wskazuje na wpływ obestatyny na jej udział w procesach proliferacji i apoptozy. Wykazano wpływ obestatyny na stymulację proliferacji komórek nowotworowych zarówno żołądka jak i jajnika i prostaty [88]. Na modelu świńskim potwierdzono, że podanie dożołądkowe enterohormonu nowonarodzonym prosiętom powoduje znaczny wzrost

indeksu mitotycznego w jelicie cienkim oraz obniżenie indeksu apoptycznego, co skutkuje przyspieszeniem rozwoju jelita cienkiego [89].

## Glutaminian

Glutaminian (anion karboksylowy kwasu glutaminowego) jest endogennym, pięciowęglowym aminokwasem posiadającym dwie grupy karboksylowe. W warunkach fizjologicznych występuje on w formie anionu, stąd wymienna nazwa glutaminian – kwas glutaminowy. Jest on jednym z najważniejszych neuroprzekaźników w ludzkim organizmie, zwłaszcza w ośrodkowym układzie nerwowym [90]. W komórkach jest syntetyzowany na trzy różne sposoby:

- na drodze reakcji dehydrogenazy glutaminianowej z  $\alpha$ -ketoglutaratu, jonu amonowego i w obecności  $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$
- na drodze reakcji aminotransferazy glutaminianowej, z  $\alpha$ -ketoglutaranu i dowolnego L-aminokwasu
- reakcji glutaminazy odłączającej jon amonowy od glutaminy [91].

Glutaminian oddziałuje na dwa typy receptorów: jonowy i metabotropowy. Poprzez receptory jonotropowe glutaminian wykazuje szybkie działanie neurotransmisyjne, natomiast poprzez receptory metabotropowe dochodzi do wolnej mediacji sygnału w synapsach [92]. Do receptorów jonotropowych należy: NMDA (receptor N-metylo-D-asparaginowy) – receptor przewodzący jony sodu, potasu i wapnia, AMPA (selektywnie aktywowany przez kwas  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy – analog glutaminianu) oraz receptory dla kwasu kinowego [93].

Ponadto dla kwasu glutaminowego istnieją receptory metabotropowe (mGlu) powiązane z aktywacją białka G. Obecnie znanych jest osiem receptorów tego typu, które podzielono

na trzy podstawowe grupy, ze względu na ich homologię sekwencji DNA, aktywność wobec szlaków sygnalizacyjnych II-rzędu oraz wybiórczość wobec agonistów [94]:

- grupa pierwsza: receptory mGlu1 i mGlu5
- grupa druga: mGlu2, mGlu3
- grupa trzecia: mGlu4, mGlu6, mGlu7 i mGlu8.

Receptory grupy pierwszej charakteryzują się wywoływaniem powolnej depolaryzacji przez fosfolipazę C, natomiast receptory z grupy drugiej i trzeciej są odpowiedzialne za powolną hiperpolaryzację za pomocą hamującego wpływu na cyklazę adenylową oraz odwrócenia przepływu jonów wapnia i potasu [95].

Receptory metabotropowe dla kwasu glutaminowego składają się z siedmiu hydrofobowych domen transbłonowych, połączonych trzema pętlami zewnątrzkomórkowymi i trzema pętlami wewnątrzkomórkowymi, posiadają dużą zewnątrzkomórkową domenę N-końcową oraz cytoplazmatyczną domenę C-końcową. Sekwencja aminokwasów receptorów mGlu jest silnie konserwatywna zarówno u ssaków jak i u innych gatunków, co wskazuje na ich znaczenie w utrzymaniu homeostazy [96].

Ekspresja *mGluR7* jest najbardziej wyrażana w OUN [97, 98]. Największa gęstość ekspresji genu receptora mGluR7 występuje w opuszce węchowej, hipokampie, podwzgórzu i czuciowych drogach aferentnych [99–102].

Receptory metabotropowe dla glutaminianu są szeroko reprezentowane w ośrodkowym układzie nerwowym. Upatruje się roli poszczególnych receptorów oraz zaburzeń w ich funkcjonowaniu jako przyczyny chorób neurodegeneracyjnych jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona czy płasawica Huntingtona [103, 104], a także padaczka,

schizofrenia czy inne choroby psychiatryczne [105]. Najmniej zbadaną grupą są receptory mGlu grupy III, głównie ze względu na brak odpowiednich środków farmakologicznych będących dla nich bodźcem do reakcji [106, 107]. Z receptorami tej grupy nierozwialnie wiąże się termin osi mózgowo-jelitowej [108].

W OUN glutaminian najczęściej syntetyzowany *de novo*, natomiast w przewodzie pokarmowym może on być łatwo pozyskiwany z białek podczas procesu trawienia w świetle przewodu pokarmowego. Ponadto glutaminian jest mediatorem w aktywacji nerwu błędnego [109]. Wśród receptorów metabotropowych dla glutaminianu szczególne zainteresowanie budzi mGlu7, ponieważ genetyczna delecja tego receptora u myszy skutkuje zmianą zachowań związanych z lękiem i stresem [107]. Odkrycie AMN082 (N,N'-dibenzhydrietano-1,2-diamino dihydrochlorek), pierwszego selektywnego agonisty receptorów mGlu7, który w swoim działaniu przypomina działanie glutaminianu przyczyniło się znacznemu pogłębieniu wiedzy na temat receptorów mGlu7 w fizjologii i zachowaniu związanym ze stresem [105, 110, 111]. Wyniki opisanych badań wskazują, że receptory mGlu7 są ważnym składnikiem mechanizmu molekularnego leżącego u podstaw depresji i lęku. Ponadto sugerują, że receptory mGlu7 mogą być celem w nowych terapiach leczenia stanów związanych z przewlekłym stresem. Niemniej jednak niewiele wiadomo na temat roli receptorów mGlu7 poza OUN.

Oprócz tego, że kwas glutaminowy jest kluczowym neuroprzekaźnikiem w OUN, jest również obecny w jelitowym układzie nerwowym (*ENS – ang. enteral nervous system*). Jego receptory jonotropowe i metabotropowe zostały wielokrotnie opisane w literaturze jako receptory obecne w ENS [112–114]. W 2010 r. Julio-Pieper i wsp. opisali aktywność metabotropowych receptorów 7 dla glutaminianinu w jelicie grubym u myszy. Wyniki

przeprowadzonego badania wykazały wysoką ekspresję *mGlu7* w błonie śluzowej jelita grubego, oraz że aktywacja receptorów *mGlu7* znacząco zwiększała *in vivo* zawartość wody w kale, a tym samym potwierdza funkcjonalne znaczenie ekspresji mRNA receptorów *mGlu7* w okrężnicy [115].

## Założenia i cel pracy

Dzieci z zaparciem stolca ciągle stanowią duży odsetek pacjentów gabinetów pediatrycznych i gastroenterologicznych. Pomimo rosnącej świadomości społeczeństwa, przestrzegania diety bogatej w błonnik oraz prawidłowo przeprowadzonych treningów korzystania z toalety zapadalność na chorobę zaparciową ciągle wzrasta [7]. W związku z tym konieczne jest poszukiwanie czynników osobniczych, które decydują o wystąpieniu zaburzenia.

Celem pracy było ustalenie udziału wybranych enterohormonów (ghreliny i obestatyny), odpowiednich dla nich receptorów (GHS-R, GPR39) oraz receptora metabotropowego glutaminianu (mGlu7) w patogenezie przewlekłej czynnościowej choroby zaparciowej u dzieci.

Cele szczegółowe:

Cele pierwszorzędowe:

1. zbadanie wpływu ghreliny na motorykę przewodu pokarmowego u dzieci,
2. zbadanie wpływu obestatyny na motorykę przewodu pokarmowego u dzieci,
3. ustalenie wzajemnych zależności pomiędzy ghreliną a obestatyną i ich wpływem na motorykę przewodu pokarmowego,
4. ustalenie udziału receptora metabotropowego 7 dla glutaminianu w regulowaniu motoryki przewodu pokarmowego u dzieci

Cele drugorzędowe:



1. wyodrębnienie postaci czynnościowego zaparcia stolca u dzieci:  
z wydłużeniem czasu pasażu jelita grubego (*colonic inertia*), postać retencyjną  
(*outlet obstruction*) i postać mieszaną

## Materiał i metody

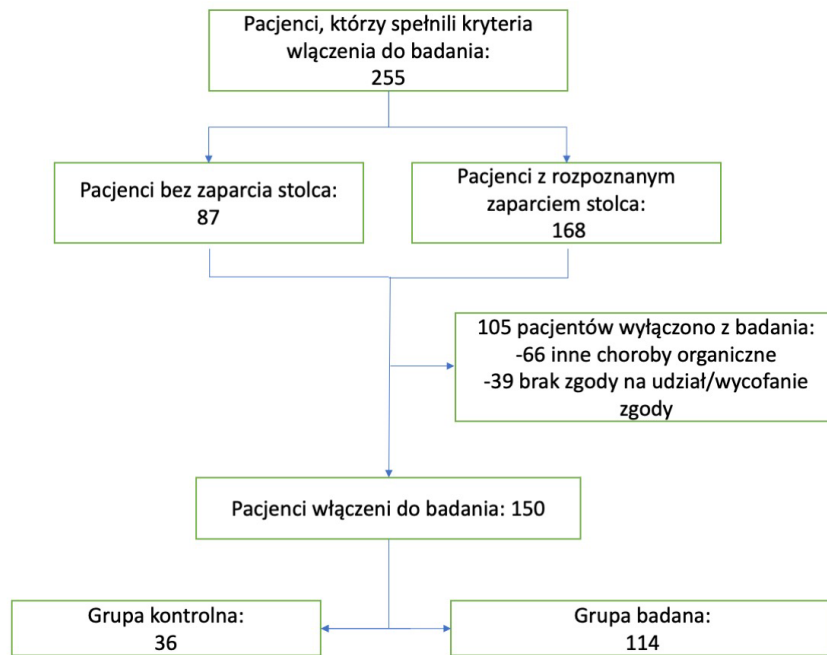
### Komisja Bioetyczna i finansowanie

Badanie przeprowadzono zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej. Do przeprowadzenia badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej mieszczącej się przy Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi – opinia z 23 sierpnia 2009 roku oraz zgoda nr 48/2017.

Badanie było finansowane z środków pozyskanych z Narodowego Centrum Nauki – nr grantu 2011/01/B/NZ7/0036.

### Dobór grupy

Do wzięcia udziału w badaniu zostało łącznie zakwalifikowanych 255. dzieci w wieku 4 - 17 lat, hospitalizowanych w latach 2009-2013 w Klinice Gastroenterologii, Alergologii i Pediatrii ICZMP w Łodzi. W tej grupie pacjentów 168 stanowiły osoby z zaparciem stolca oraz z objawami towarzyszącymi (ból brzucha, bolesna defekacja, krwawienie z odbytu, wzdęcia). 87. dzieci z objawami przewlekłych, silnych bólów brzucha, bez zaparcia i bez cech klinicznych choroby organicznej zostało zakwalifikowanych do grupy kontrolnej. Zarówno z grupy badanej jak i z grupy kontrolnej wykluczono łącznie 90 pacjentów z dalszego udziału w badaniu z uwagi na niespełnienie wszystkich kryteriów włączenia, bądź spełnienie któregoś z kryteriów wyłączenia z badania. U 66. osób w wyniku badań dodatkowych ustalono tło organiczne prezentowanych objawów, a 39 osób nie wyraziło zgody i/lub zrezygnowało z dalszego udziału w badaniu. Ostatecznie do badania zostało włączonych 150. pacjentów (114 dzieci z zaparciem i 36 grupa kontrolna). (Rysunek 1.).



Rysunek 1. Schemat procesu włączenia pacjentów do udziału w badaniu.

#### Kryteria włączenia do badania:

- dzieci obojga płci w wieku 4 - 18 lat, u których rozpoznano zaparcie stolca wg wówczas obowiązujących Kryteriów Rzymskich III
- pełna współpraca ze strony pacjenta
- pisemna zgoda pacjenta i opiekuna prawnego na udział w badaniu

#### Kryteria wyłączenia:

- brak pisemnej zgody na udział w badaniu / wycofanie zgody na dalszy udział w badaniu
- rozpoznanie choroby przewodu pokarmowego innej niż czynnościowe zaparcie stolca
- rozpoznanie organicznej przyczyny zaparcia stolca
- brak współpracy ze strony pacjenta i/lub opiekuna
- obecność przeciwwskazań do przeprowadzenia zaplanowanych badań

## Metody badawcze

### Badanie ogólnolekarskie

Z każdym pacjentem oraz z jego rodzicem/opiekunem prawnym przed włączeniem do badania przeprowadzono wywiad lekarski, uwzględniający obowiązujące wówczas kryteria rozpoznania czynnościowego zaparcia stolca (Kryteria Rzymskie III), przedstawiono założenia badania oraz pozostawiono odpowiednią ilość czasu na zastanowienie się oraz podpisanie zgody na udział w badaniu. Wcześniej wyczerpująco udzielono odpowiedzi na wszystkie zadane przez pacjenta bądź opiekuna pytania dotyczące badania.

Zgodę na udział w badaniu uzyskano w formie pisemnej od rodziców/opiekunów prawnych oraz od dziecka, w przypadku gdy ukończyło 16 rok życia.

Badanie fizykalne pozwoliło na wstępną identyfikację innych chorobowych przyczyn zaparcia stolca.

### USG jamy brzusznej

U każdego dziecka przeprowadzono USG jamy brzusznej z oceną przestrzeni zaotrzewnowej i miednicy mniejszej w celu wykluczenia organicznych przyczyn zaparcia stolca. W trakcie badania oceniano średnicę bańki odbytnicy, często identyfikując megarectum. Badanie zostało przeprowadzone w Zakładzie Radiologii ICZMP przy pomocy aparatu Aloka ProSound Alpha 6.

### Test Hintona

Badanie czasu pasażu przewodu pokarmowego u pacjentów z zaparciem stolca przeprowadzono za pomocą testu Hintona. Do badania wykorzystano znaczniki składające się

z 20 cieniодajnych w RTG granulek umieszczonych w opłatku. Pacjenci byli proszeni o połykanie, przez sześć kolejnych dni zawartości jednego opłatka o stałej porze dnia. Siódmego dnia przeprowadzano przeglądowe RTG jamy brzusznej. Następnie widoczną liczbę znaczników mnożono razy 1,2 uzyskując tym samym czas pasażu przewodu pokarmowego w godzinach [h] [116].

#### Badania endoskopowe

U pacjentów z przewlekłymi bólami brzucha, krwawieniem z przewodu pokarmowego, wzdęciami, bolesną defekacją przeprowadzono gastroskopię oraz sigmoidoskopię po uprzednim uzyskaniu osobnej pisemnej zgody rodzica/opiekuna, a w przypadku dziecka powyżej 16. roku życia również pisemnej zgody pacjenta. Badania zostały przeprowadzone w Pracowni Endoskopowej Kliniki Gastroenterologii, Alergologii i Pediatrii Instytutu CZMP w Łodzi. Do badań używano gastrofiberoskopów EVIS GIF-Q165 firmy Olympus oraz kolonoskopów EVIS CF-H185L i PCF-PH190L firmy Olympus. Stosowane do zabiegów endoskopy i szczypczyki poddawano 45 min procesowi mycia i dezynfekcji w automatycznej myjni Autodesinfector II i ETDII (Olympus).

U dzieci młodszych, niedeklarujących współpracy badania były przeprowadzane w znieczuleniu ogólnym. Znieczulenie było przeprowadzane przez lekarza specjalistę anestezyjologii przy użyciu preparatów dożylnych (propofol, fentanyl). W trakcie zabiegu oraz przez 2 godziny po znieczuleniu były monitorowane parametry życiowe.

Podczas endoskopii górnego odcinka przewodu pokarmowego makroskopowo oceniono błonę śluzową przełyku, żołądka oraz dwunastnicy. W trakcie endoskopii dolnego odcinka przewodu pokarmowego oceniano makroskopowo błonę śluzową odbytnicy, esicy

i zstępniczy. Oprócz standardowo pobieranych biopsji (badania patomorfologiczne i badania identyfikujące bakterie produkujące ureazę np. *Helicobacter pylori*), pobierano dodatkowo wycinki błony śluzowej żołądka oraz odbytnicy w celu oznaczenia ekspresji genów odpowiednich receptorów. Pobrane wycinki umieszczono w probówkach Eppendorff; do czasu wykonania oznaczeń preparaty przetrzymywano w zamrażarce w temperaturze -80 st C.

#### Ekspresja genów dla wybranych receptorów

Całkowite RNA wyizolowano z bioptatów oraz oczyszczono przy użyciu zestawu RNeasy Lipid Tissue Midi Kit (Qiagen, Niemcy) wg protokołu opracowanego przez producenta. Całkowite RNA było ocenione przy użyciu spektrofotometru Nano-Drop ND-2000 (THERMO Scientific, USA). Synteza cDNA została przeprowadzona za pomocą zestawu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, USA) z 1µg całkowitego RNA w termocyklerze MJ Research Thermal Cycler (Model PTC-200, USA).

Ekspresja mRNA receptorów GHS-R, GPR39 i mGlu7 została zmierzona za pomocą ilościowego real-time PCR, przy użyciu komercyjnie zaprojektowanych starterów TaqMan Gene Expression Assays (Hs00269780\_s1, Hs00230762\_m1, Hs00356067\_m1 respectively, Applied Biosystem, USA) przy użyciu 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, USA). RNA dla dehydrogenazy aldehydu glicero-3-fosforanowego (GADPH) było użyte jako endogenna kontrola. Wyniki ekspresji genów dla wybranych receptorów zostały przedstawione jako stosunek ich ekspresji do ekspresji *GADPH*.

Mieszanina reakcyjna składała się z 5µl cDNA, 10µl TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem, USA) i 2µl z każdego zestawu TaqMan Gene Expression Assay. Profil

termiczny przebiegał następująco: 2 min w 50°C, 10 min w 95°C, następnie 40 cykli po 15 sekund w 95°C i 1 min w 60°C. Dane uzyskane były poddane analizie przy pomocy oprogramowania RQ Manager Software (Life Technologies, USA).

#### Stężenia ghreliny i obestatyny

Stężenia ghreliny i obestatyny były ocenione za pomocą testu ELISA przy użyciu Human Ghrelin ELISA Kit (MyBiosource, San Diego USA) i Human Obestatin ELISA Kit (MyBiosource, San Diego USA) zgodnie z zaleceniami producenta.

W celu oznaczenia stężeń enterohormonów w surowicy pobrano od każdego pacjenta 2,7ml krwi żyłnej, w zamkniętym próżniowym systemie pobierania krwi, do próbki zawierającej EDTA (*ang.: ethylenediaminetetraacetic acid* - kwas wersenowy). Materiał był pobierany od pacjentów pozostających co najmniej 10 godzin na czczo. Po wykrzepnięciu krwi każdą próbkę odwirowano przez 15min z prędkością 2500 obr./min. Odciągnięty supernatant przeniesiono za pomocą jednorazowej pipety do osobnej próbki Eppendorf, a następnie po oznakowaniu, zamrożono w temperaturze -70°C do czasu przeprowadzenia oznaczeń, jednak nie dłużej niż do 2 miesięcy.

#### Ghrelina:

Przed dokonaniem pomiarów ogrzano odczynniki i próbki do temperatury pokojowej.

Do każdego dołka studzienki nakroplono 100µl standardu i próbki, następnie inkubowano przez 2 godziny w 37°C. Trzykrotnie przemyto każdą studzienkę wypełniając buforem do przemywania (250µl). Podczas ostatniego mycia usunięto pozostały bufor do płukania przez odsączenie.

Następnym krokiem było dodanie 100µl koniugatu biotyny do każdej studzienki oraz inkubowano przez 1 godzinę w 37°C. Ponownie trzykrotnie przemyto każdą studzienkę wypełniając buforem do przemywania (250µl). Podczas ostatniego mycia usunięto pozostały bufor do płukania przez odsączenie. W kolejnym etapie dodano 100µl streptawidyny-HRP (1x) do każdego dołka oraz inkubowano przez kolejną godzinę w 37°C. Następnie pięciokrotnie przemyto każdą studzienkę buforem do przemywania (250µl). W trakcie ostatniego mycia bufor został odsączony.

W kolejnym etapie dodano 100µl roztworu substratu do każdej studzienki. Preparat był inkubowany przez 15 minut w temperaturze 37°C.

Następnie dodano 50µl roztworu zatrzymującego reakcję do każdego dołka do czasu aż pierwsze cztery studzienki zawierające najwyższe stężenie standardów zmieniły kolor na niebieski.

Ostatni etap polegał na określeniu gęstości optycznej za pomocą spektrofotometru.

Czytnik mikroplatek ustawiono na długość fali 450nm.

Obestatyna:

Przed użyciem ogrzano odczynniki i próbki do temperatury pokojowej. Do każdej studzienki dodano 50 µl wzorca i próbki, następnie dodano 50µl biotynylu oraz poddano inkubacji przez 45min w 37°C. Preparat przemyto 3-krotnie.

W kolejnym etapie dodano 100µl koniugatu HRP do każdej studzienki oraz inkubowano przez 30min w 37°C. Po inkubacji preparat przemyto 5-krotnie. Dodano 90µl substratu odczynnika oraz inkubowano 15min w temperaturze 37°C. Następnie dodano 50 µl roztworu zatrzymującego reakcję. Ostatni etap polegał na określeniu gęstości optycznej za pomocą spektrofotometru. Czytnik mikroplatek ustawiono na długość fali 450nm.



## Analiza statystyczna

Statystyczne opracowanie zgromadzonego materiału polegało na wskazaniu wartości minimalnych i maksymalnych, obliczono średnie arytmetyczne, mediany, a także obliczono parametry określające wewnętrzne zróżnicowanie analizowanych zmiennych - odchylenia standardowe. Wszystkie uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą oprogramowania statystycznego R (wersja 3.4.3), Wiedeń, Austria.

W związku z tym, iż rozkład cech odbiegał od normalnego, do oceny istotności różnic wartości pomiędzy grupami wykorzystano test ANOVA. Korelacje analizowanych zmiennych w dwóch grupach oceniano za pomocą testu Spearmana. Za istotne statystycznie uznano wartości  $p < 0,05$ .

## Wyniki

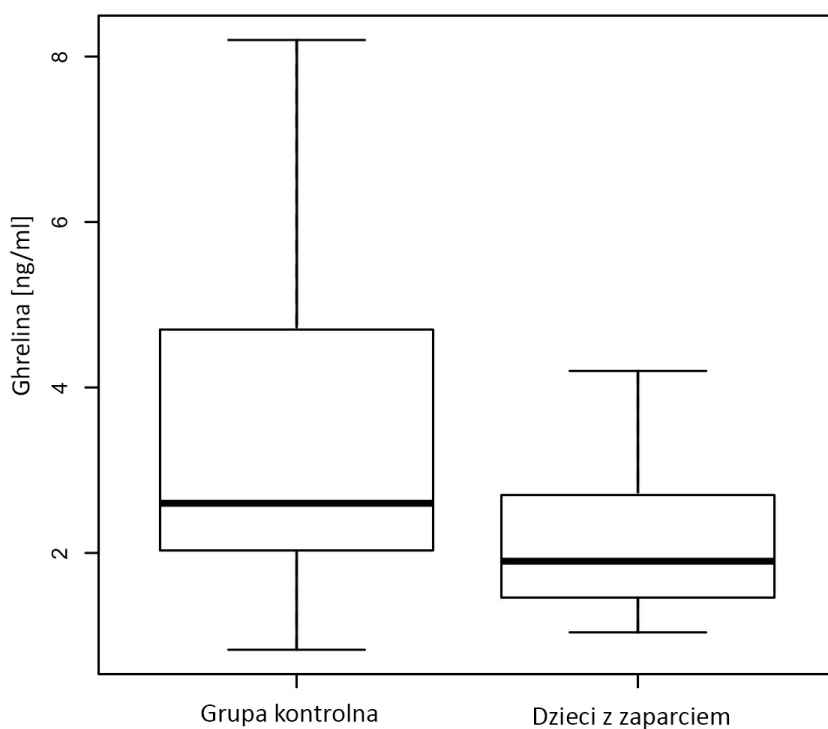
Do grupy badanej włączono łącznie 114. dzieci – 47 chłopców oraz 67 dziewczynek. Średni wiek pacjentów w grupie osób z zaparciem stolca wyniósł 10,32 lat, z medianą 10 lat, odchylenie standardowe wyniosło 3,85. Do grupy kontrolnej zostało włączonych 36 dzieci (17. chłopców i 19 dziewczynek). Średni wiek pacjentów włączonych do grupy kontrolnej wyniósł 12,53 lat, mediana 13, odchylenie standardowe 3,65 (Tabela 1.).

Tabela 1. Charakterystyka zbadanej populacji.

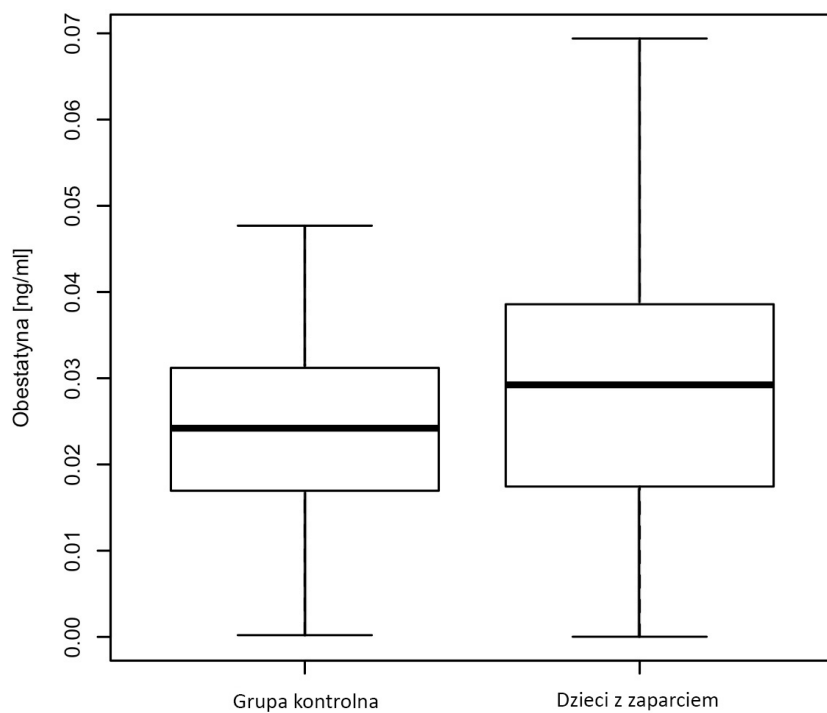
| Grupa                       | Liczba N    | Wiek [lata] |                        |         | Masa ciała [kg] |                        |         | Wzrost [cm] |                        |         |       |
|-----------------------------|-------------|-------------|------------------------|---------|-----------------|------------------------|---------|-------------|------------------------|---------|-------|
|                             |             | Średnia     | Odchylenie standardowe | Mediana | Średnia         | Odchylenie standardowe | Mediana | Średnia     | Odchylenie standardowe | Mediana |       |
| Pacjenci z zaparciem stolca | 114         | 10,32       | 3,85                   | 10,0    | 35,03           | 16,25                  | 31,4    | 136,72      | 23,21                  | 137,0   |       |
|                             | dziewczynki | 67          | 10,75                  | 3,81    | 10,0            | 34,86                  | 14,79   | 29,6        | 138,73                 | 24,56   | 136,0 |
|                             | chłopcy     | 47          | 9,70                   | 3,94    | 10,0            | 35,26                  | 18,10   | 34,0        | 133,98                 | 20,94   | 146,5 |
| Grupa kontrolna             | 36          | 12,53       | 3,65                   | 13,0    | 43,08           | 17,51                  | 42,0    | 143,31      | 29,06                  | 146,7   |       |
|                             | dziewczynki | 19          | 12,58                  | 3,46    | 13,0            | 42,34                  | 17,29   | 43,5        | 146,58                 | 17,02   | 147,1 |
|                             | chłopcy     | 17          | 12,47                  | 3,94    | 13,0            | 43,92                  | 18,15   | 40,5        | 139,65                 | 38,65   | 146,2 |
| Razem                       | 150         | 10,85       | 3,91                   | 11,0    | 37,22           | 16,92                  | 14,0    | 138,50      | 24,99                  | 139,0   |       |

## Porównanie stężenia enterohormonów w badanych grupach pacjentów

Stwierdzono istotnie statystycznie mniejsze stężenia ghreliny w osoczu dzieci z zaparciem stolca w stosunku do dzieci z grupy kontrolnej (1,9 ng/ml vs. 2,6 ng/ml,  $p < 0,05$ ), co przemawia za pozytywnym wpływem ghreliny na motorykę przewodu pokarmowego (Rysunek 2.). Nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w medianach wartości stężeń obestatyny pomiędzy grupami ( $p = 0,297$ ), natomiast stężenia obestatyny były niższe u dzieci z zaparciem stolca (0,0242 ng/ml vs. 0,02923 ng/ml) (Rysunek 3.).



Rysunek 2. Porównanie stężenia ghreliny w osoczu pacjentów z grupy kontrolnej oraz grupy badanej.



Rysunek 3. Porównanie stężenia obestatyny w osoczu pacjentów z grupy kontrolnej oraz z grupy badanej.

Potwierdzono niższy stosunek wartości stężeń ghreliny do obestatyny u pacjentów z zaparciem stolca w porównaniu do pacjentów z grupy kontrolnej (72,83 vs. 129,58,  $p=0,01$ ), co sugeruje dysproporcję stężeń enterohormonów w surowicy krwi pacjentów cierpiących z powodu zaparcia stolca (Tabela 2.).

Tabela 2. Stężenia ghreliny i obestatyny w obu grupach.

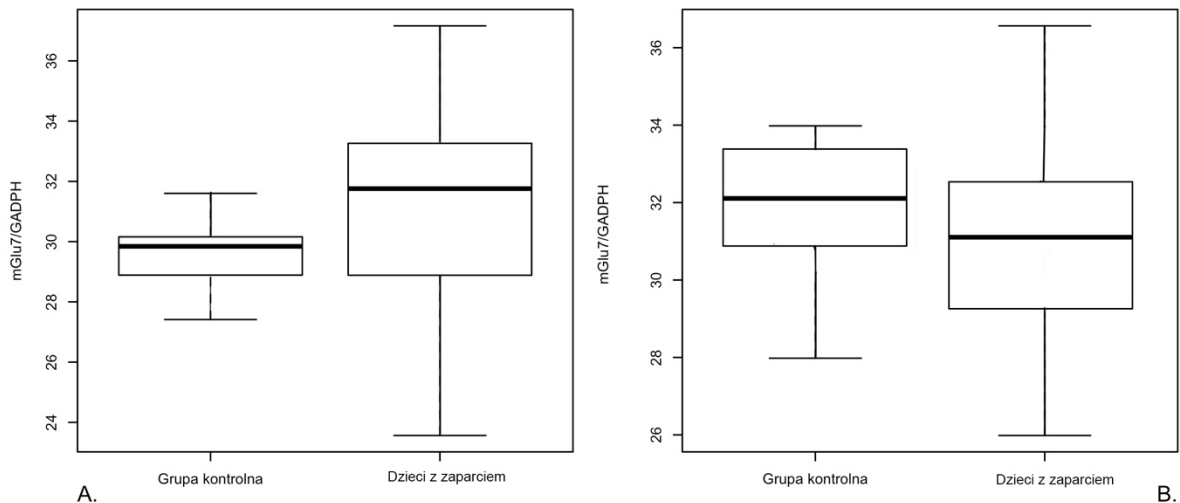
|                              | Pacjenci z zaparciem stolca | Grupa kontrolna | Istotność statystyczna - p |
|------------------------------|-----------------------------|-----------------|----------------------------|
| Ghrelina [ng/ml]             | Min                         | 1.04            | 0,83                       |
|                              | Max                         | 23.2            | 27                         |
|                              | Średnia                     | 2,879504132     | 4,296857143                |
|                              | Mediana                     | 4,4075          | 4,3984                     |
| Obestatyna [ng/ml]           | Min                         | 0,0000203       | 0,000199                   |
|                              | Max                         | 0,09254         | 0,1476                     |
|                              | Średnia                     | 0,030372482     | 0,030601083                |
|                              | Mediana                     | 0,02923         | 0,0242                     |
| Stosunek ghrelina/obestatyna | Min                         | 21,82936203     | 13,19796954                |
|                              | Max                         | 8040,201005     | 1000000                    |
|                              | Średnia                     | 424,8445373     | 8773,197027                |
|                              | Mediana                     | 129,5774648     | 72,831816                  |

## Porównanie ekspresji receptorów (mGlu7, GHS-R, GPR39) w badanych grupach pacjentów

### Receptor glutaminianu

Stwierdzono wyższe średnie wartości ekspresji mRNA receptorów dla mGlu7 w biopsjach pobranych z błony śluzowej żołądka dzieci z zaparciem stolca niż u dzieci bez zaparcia (32,281 vs. 31,439,  $p=0,03$ ), natomiast w biopsjach pobranych z błony śluzowej odbytnicy zaobserwowano odwrotną zależność, tj. znacznie niższe wartości ekspresji u pacjentów z zaparciem stolca w porównaniu do grupy kontrolnej (31,2 vs. 32,4,  $p<0,05$ ),

co może potwierdzać hipotezę, że u pacjentów z zaparciem stolca obserwuje się niższą ekspresję mRNA dla mGlu7 (Rysunek 4.).



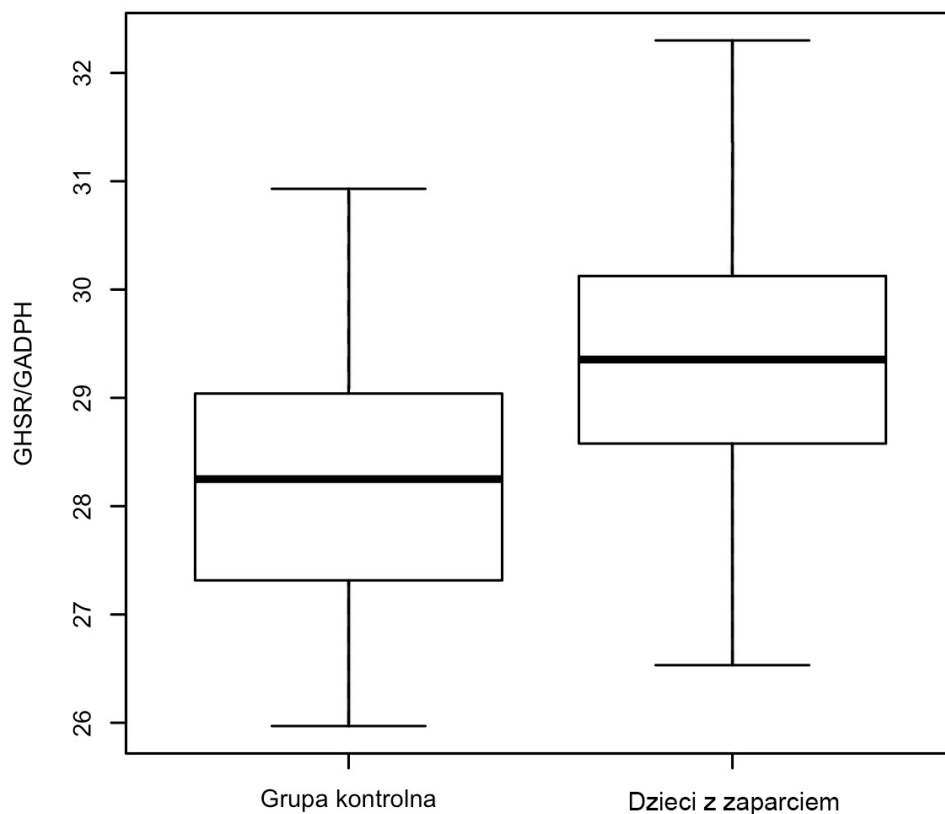
Rysunek 4. Porównanie ekspresji mRNA dla receptorów mGlu7 grupa kontrolna vs. pacjenci z chorobą zaparciową: A. w biopsjach z żołądka, B. W biopsjach z odbytnicy.

#### Receptor ghreliny

Zaobserwowano wyższe średnie wartości ekspresji mRNA receptora dla ghreliny w biopsjach pobranych z odbytnicy dzieci z zaparciem stolca, w porównaniu do grupy kontrolnej (29,35 vs. 28,25,  $p < 0,05$ ). Sugeruje to, że jedną z przyczyn zaparcia może być deficyt oddziaływania ghreliny. (Rysunek 5).

#### Receptor obestatyny

U dzieci z zaparciem stolca zaobserwowano również wyższą ekspresję mRNA dla GPR39 w biopsjach pobranych z odbytnicy (31,03 vs. 26,92,  $p < 0,05$ ). (Tabela 3.)



Rysunek 5. Porównanie ekspresji mRNA dla receptorów ghreliny w odbytnicy

Tabela 3. Ekspresja mRNA receptorów ghreliny, obestatyny oraz receptora metabotropowego 7 dla glutaminianu.

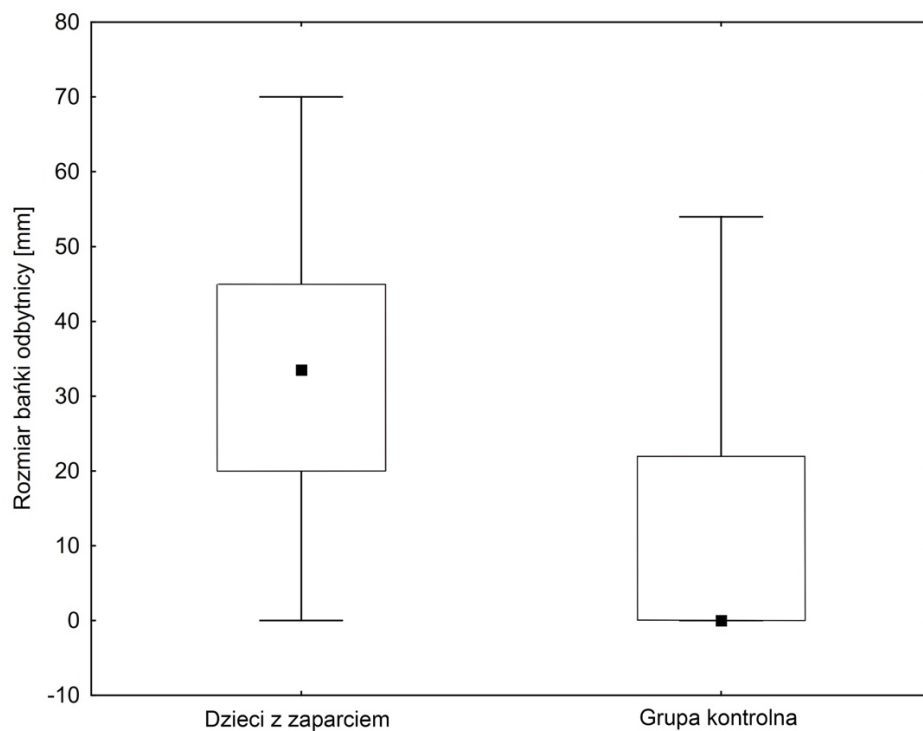
| Receptor | Pacjenci z zaparciem stolca |        |         |         | Grupa kontrolna |       |          |         | Istotność statystyczna - p |
|----------|-----------------------------|--------|---------|---------|-----------------|-------|----------|---------|----------------------------|
|          | Min                         | Max    | Średnia | Mediana | Min             | Max   | Średnia  | Mediana |                            |
| GHS-R.S  | 26,354                      | 35,98  | 29,5291 | 29,457  | 20,91           | 39,84 | 29,49305 | 28,99   | 0,24806997                 |
| GPR39.S  | 23,599                      | 37,818 | 30,0010 | 31,642  | 23,96           | 37,99 | 27,94470 | 27,32   | 0,07245883                 |
| mGlu7.S  | 20,827                      | 38,952 | 32,2808 | 32,485  | 27,98           | 33,98 | 31,43861 | 31,47   | <b>0,03037529</b>          |
| GHS-R.R  | 14,31                       | 36,8   | 29,3485 | 29,354  | 25,97           | 33,98 | 28,62944 | 28,25   | <b>0,00040186</b>          |
| GPR39.R  | 14,63                       | 36,468 | 29,8766 | 31,027  | 24,16           | 35,58 | 27,42083 | 26,92   | <b>0,00212517</b>          |
| mGlu7.R  | 23,564                      | 37,163 | 31,1893 | 31,759  | 28,09           | 34,93 | 32,39833 | 32,62   | <b>0,01631402</b>          |

GHS-R.S - Ekspresja mRNA receptora ghreliny w żołądku, GPR39.S - Ekspresja mRNA obestatyny w żołądku, mGlu7.S – Ekspresja mRNA receptora glutaminianu w żołądku, GHS-R.R - Ekspresja mRNA receptora ghreliny w odbytnicy, GPR39.R- Ekspresja mRNA receptora ghreliny w odbytnicy, mGlu7.R - Ekspresja mRNA receptora glutaminianu w odbytnicy



## Porównanie wielkości bańki odbytnej w obu grupach

U pacjentów z obu grup w trakcie badania ultrasonograficznego jamy brzusznej oceniono średnicę bańki odbytnej. Zaobserwowano zdecydowanie wyższe średnie wartości pomiarów w grupie dzieci z zaparciem w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0.05$ ) (rysunek 6.).



Rysunek 6. Porównanie średnicy bańki odbytnej w obu grupach pacjentów.

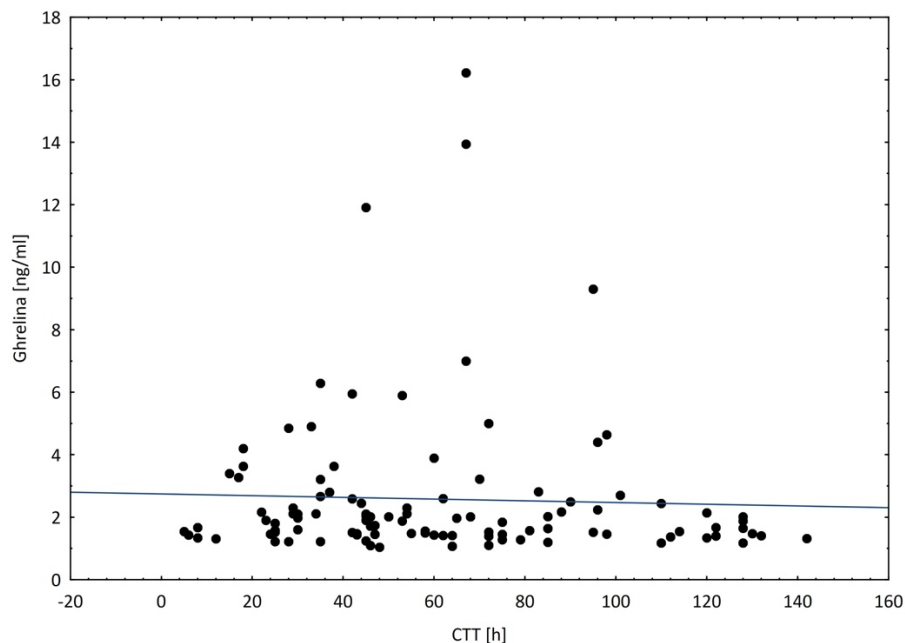
## Korelacje

### Pacjenci z zaparciem stolca

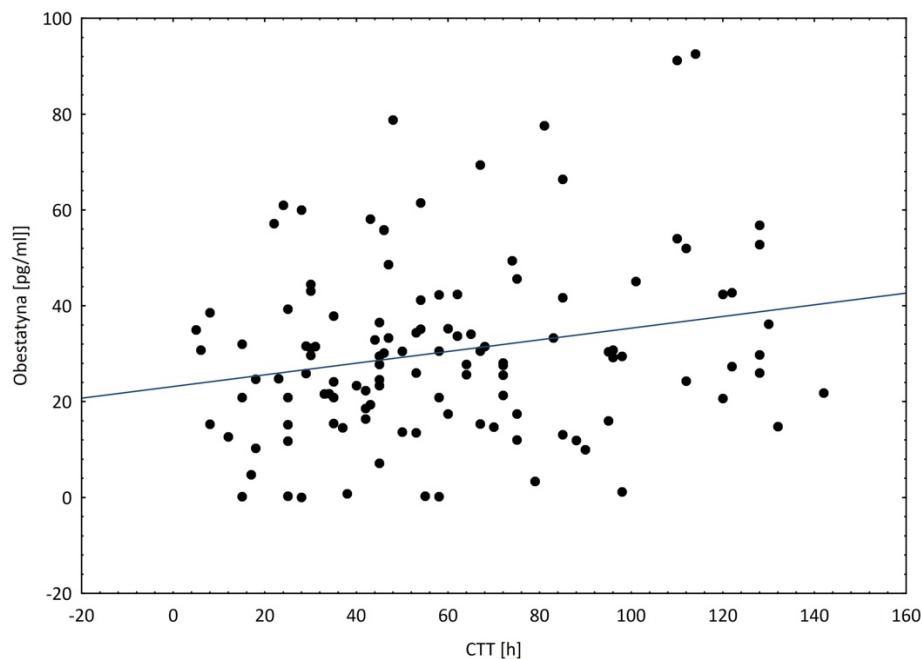
Zaobserwowana negatywną korelację pomiędzy stężeniem ghreliny a czasem pasażu jelitowego oraz pozytywną korelację pomiędzy stężeniem obestatyny a czasem pasażu jelitowego, co udowadnia wpływ enterohormonów na motorykę przewodu pokarmowego. (Rysunek 7. i 8.)

W grupie badanej zaobserwowano pozytywną korelację pomiędzy ekspresją genów receptorów dla ghreliny i glutaminianu w biopsjach błony śluzowej żołądka ( $\rho=0,3$ ;  $p<0,05$ ). W tej grupie pacjentów zaobserwowano również pozytywną, słabą, jednak istotną statystycznie korelację pomiędzy ekspresją *mGlu7* w biopsjach z błony śluzowej żołądka oraz ekspresją *mGlu7* w biopsjach z odbytnicy ( $\rho=0,23$ ;  $p=0,02$ ). Zaobserwowano również słabą, pozytywną korelację pomiędzy obecnością GPR39 w biopsjach pobranych z odbytnicy oraz stężeniem ghreliny w osoczu ( $\rho=0,19$ ;  $p=0,04$ ).

W grupie pacjentów z czynnościowym zaparciem stolca wykazano pozytywną korelację pomiędzy ekspresją receptora ghreliny (GHS-R) i receptora obestatyny (GPR39) w błonie śluzowej odbytnicy ( $\rho=0,4$ ;  $p<0,05$ ). W tej grupie pacjentów wykazano ujemną korelację pomiędzy stężeniem ghreliny w osoczu a czasem pasażu przewodu pokarmowego ( $\rho=-0,23$ ;  $p=0,01$ ) oraz pozytywną korelację pomiędzy stężeniem obestatyny a czasem pasażu przewodu pokarmowego ( $\rho=0,18$ ;  $p<0,05$ ).



Rysunek 7. Korelacja stężenia ghreliny z czasem pasażu jelitowego.



Rysunek 8. Korelacja stężenia obestatylny z czasem pasażu jelitowego.

#### Grupa kontrolna

W grupie kontrolnej wykazano niewielką pozytywną korelację pomiędzy ekspresją genów receptorów ghreliny i receptorów obestatylny w bioptatach pobranych z błony śluzowej żołądka ( $\rho=0,47$ ;  $p<0,005$ ).

W tej samej grupie udowodniono silną pozytywną korelację pomiędzy ekspresją genów receptorów ghreliny i receptorów obestatylny w bioptatach pobranych z błony śluzowej odbytnicy ( $\rho=0,74$ ;  $p<0,05$ ).

W grupie kontrolnej zaobserwowano również umiarkowaną pozytywną zależność pomiędzy ekspresją receptora obestatylny (GPR39) w bioptatach pobranych z błony śluzowej żołądka oraz stężeniem obestatylny w surowicy krwi obwodowej ( $\rho=0,45$ ;  $p<0,05$ ) (Tabela 4.).

Tabela 4. Korelacje czasu pasażu jelitowego, ekspresji badanych receptorów oraz stężenia badanych enterohormonów.

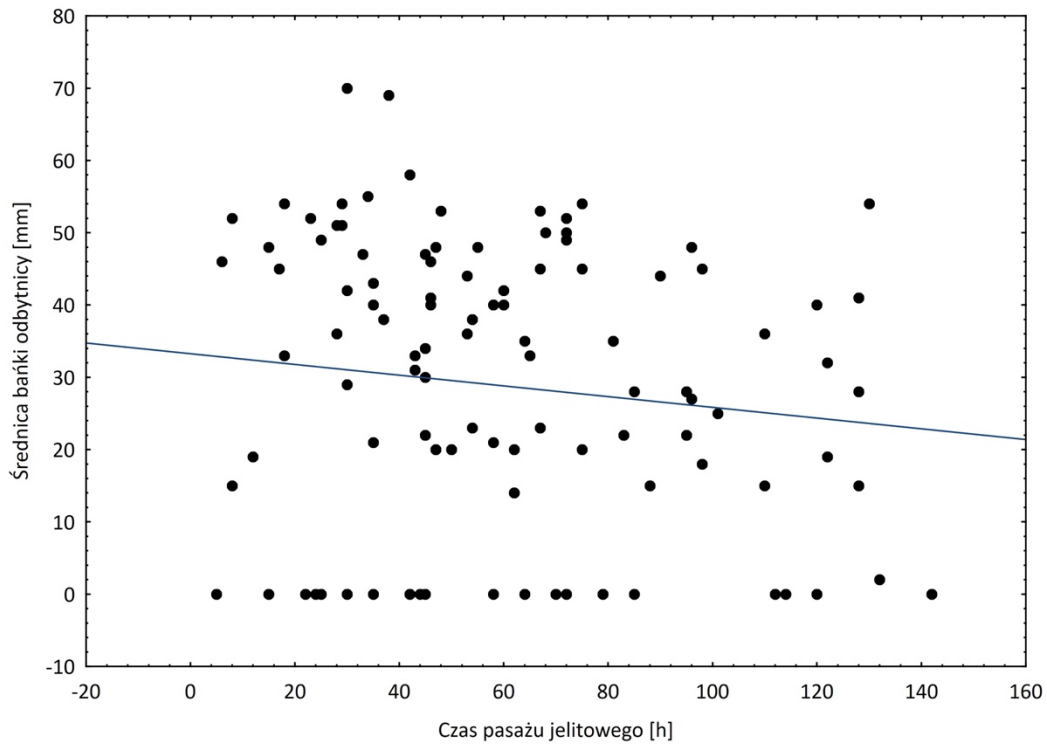
| Korelacje                      | Pacjenci z zaparciem       |              | Grupa kontrolna            |            |
|--------------------------------|----------------------------|--------------|----------------------------|------------|
|                                | Istotność statystyczna - p | rho          | Istotność statystyczna - p | rho        |
| CTT VS GHSR.S                  | 0,366365923                | -0,085009357 | N/A                        | N/A        |
| CTT VS GPR39.S                 | 0,402610558                | 0,086858508  | N/A                        | N/A        |
| CTT VS GRM7.S                  | 0,967117484                | -0,004032604 | N/A                        | N/A        |
| CTT VS GHSR.R                  | 0,694008387                | -0,036128905 | N/A                        | N/A        |
| CTT VS GPR39.R                 | 0,859604345                | -0,017301361 | N/A                        | N/A        |
| CTT VS GRM7.R                  | 0,675419788                | 0,039461846  | N/A                        | N/A        |
| CTT VS Ghrelina                | <b>0,010755435</b>         | -0,231118616 | N/A                        | N/A        |
| CTT VS Obestatyna              | <b>0,043476737</b>         | 0,183894947  | N/A                        | N/A        |
| CTT VS Ghrelina/Obestatyna     | <b>0,006490714</b>         | -0,246180829 | N/A                        | N/A        |
| GHSR.S VS GPR39.S              | 0,213446123                | 0,128819348  | <b>0,00483707</b>          | 0,47191015 |
| GHSR.S VS GRM7.S               | <b>0,001586272</b>         | 0,301730599  | 0,33144435                 | -0,166613  |
| GHSR.S VS GHSR.R               | 0,344880646                | 0,088877666  | 0,83989063                 | 0,03489345 |
| GHSR.S VS GPR39.R              | 0,722701543                | -0,035562618 | 0,37145655                 | 0,15348958 |
| GHSR.S VS GRM7.R               | 0,091761923                | 0,162304805  | 0,96699743                 | -0,0071479 |
| GHSR.S VS Ghrelina             | 0,905999132                | 0,0111329    | 0,97385397                 | -0,0057487 |
| GHSR.S VS Obestatyna           | 0,678825525                | -0,039023476 | <b>0,00643635</b>          | 0,44576066 |
| GHSR.S VS Ghrelina/Obestatyna  | 0,905457713                | -0,01119732  | 0,14638899                 | -0,2506656 |
| GPR39.S VS GRM7.S              | <b>7,63E-19</b>            | 0,759111484  | 0,06173783                 | 0,32380807 |
| GPR39.S VS GHSR.R              | 0,089395778                | -0,175240595 | 0,33511933                 | 0,17046149 |
| GPR39.S VS GPR39.R             | 0,713068728                | 0,040469629  | <b>0,02070762</b>          | 0,39520135 |
| GPR39.S VS GRM7.R              | 0,196673828                | 0,137366437  | 0,9159476                  | 0,01880159 |
| GPR39.S VS Ghrelina            | 0,135476018                | -0,154287135 | 0,57736858                 | 0,10063525 |
| GPR39.S VS Obestatyna          | 0,548664762                | -0,062299213 | 0,20215142                 | 0,22432763 |
| GPR39.S VS Ghrelina/Obestatyna | 0,651462921                | -0,046942475 | 0,59152219                 | -0,0965909 |
| GRM7.S VS GHSR.R               | 0,278051177                | -0,10581075  | 0,36538124                 | 0,15542541 |
| GRM7.S VS GPR39.R              | 0,871020565                | 0,016700748  | 0,29220408                 | 0,18047242 |
| GRM7.S VS GRM7.R               | <b>0,018757419</b>         | 0,233528644  | 0,67494338                 | 0,07235741 |
| GRM7.S VS Ghrelina             | 0,662859239                | 0,042628235  | 0,44043018                 | -0,1346976 |
| GRM7.S VS Obestatyna           | 0,774145269                | -0,028065354 | 0,38146441                 | -0,1503411 |
| GRM7.S VS Ghrelina/Obestatyna  | 0,704773037                | 0,037050825  | 0,99299147                 | 0,00154072 |
| GHSR.R VS GPR39.R              | <b>2,27E-05</b>            | 0,397214745  | <b>2,00E-07</b>            | 0,74390166 |
| GHSR.R VS GRM7.R               | 0,707827419                | 0,035322967  | 0,07396974                 | 0,30146776 |
| GHSR.R VS Ghrelina             | 0,280113908                | 0,098973629  | 0,08440705                 | -0,2958655 |
| GHSR.R VS Obestatyna           | 0,588570922                | -0,049658567 | 0,48822255                 | 0,11932038 |
| GHSR.R VS Ghrelina/Obestatyna  | 0,310261376                | 0,093008368  | 0,12507408                 | -0,2641457 |

|                                   |                    |              |            |            |
|-----------------------------------|--------------------|--------------|------------|------------|
| GPR39.R VS GRM7.R                 | 0,063107465        | 0,18470212   | 0,09364146 | 0,28365416 |
| GPR39.R VS Ghrelina               | <b>0,045687601</b> | 0,193621868  | 0,25975272 | -0,1957528 |
| GPR39.R VS Obestatyna             | 0,332594593        | -0,094567818 | 0,43144632 | 0,13528995 |
| GPR39.R VS<br>Ghrelina/Obestatyna | 0,056670715        | 0,184824884  | 0,22952935 | -0,2084326 |
| GRM7.R VS Ghrelina                | 0,512997406        | 0,061617499  | 0,10716334 | -0,2770223 |
| GRM7.R VS Obestatyna              | 0,126820577        | -0,143200694 | 0,20610236 | -0,2158491 |
| GRM7.R VS<br>Ghrelina/Obestatyna  | 0,067605699        | 0,171037343  | 0,54161762 | 0,1067526  |
| Ghrelina VS Obestatyna            | 0,073699667        | -0,163190646 | 0,97067699 | -0,0064475 |

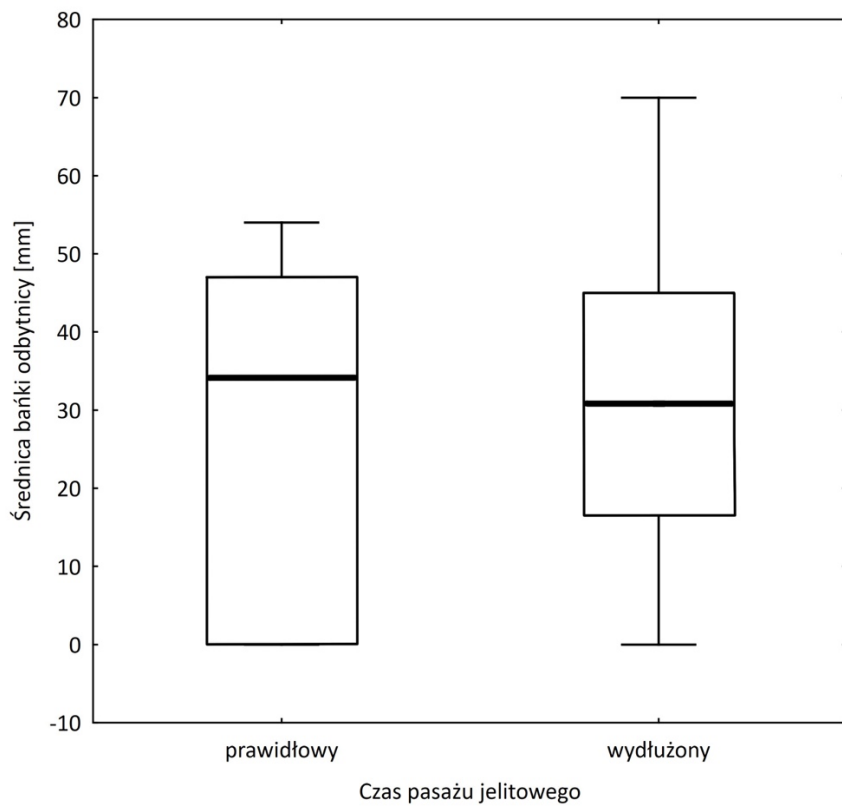
*GHS-R.S - Ekspresja mRNA receptora ghreliny w żołądku, GPR39.S - Ekspresja mRNA obestatyny w żołądku, mGlu7.S – Ekspresja mRNA receptora glutaminianu w żołądku, GHS-R.R - Ekspresja mRNA receptora ghreliny w odbytnicy, GPR39.R- Ekspresja mRNA receptora ghreliny w odbytnicy, mGlu7.R - Ekspresja mRNA receptora glutaminianu w odbytnicy*

#### Korelacje czasu pasażu jelitowego (test Hintona) i rozmiarów bańki odbytnicy w USG

W grupie dzieci z zaparciem stolca oceniono korelację pomiędzy średnicą bańki odbytnicy a pasażem przewodu pokarmowego. Wykazano ujemną wartość korelacji, natomiast nie jest ona istotna statystycznie ( $\rho = -0,0119$ ;  $p = 0,214$ ). Można natomiast zaobserwować trend wskazujący na to, że w zaparciu typu *colonic inertia* nie obserwuje się zwiększenia bańki odbytnicy, co z kolei można jest obecne w typie retencyjnym zaparcia stolca (Rysunek 9., Rysunek. 10.).



Rysunek 9. Korelacja średnicy bańki odbytnej z czasem pasażu jelitowego.



Rysunek 10. Porównanie średnicy bańki odbytnej u dzieci z prawidłowym i wydłużonym czasem pasażu jelitowego.

W grupie dzieci z rozpoznaniem zaparciem stolca (n=114) stwierdzono u ponad połowy pacjentów (64,9%) poszerzenie bańki odbytnicy oraz zwolniony pasaż jelitowy. U ¼ badanych dzieci (25,4%) zaobserwowano poszerzoną bańkę odbytnicy z prawidłowym pasażem jelitowym, w pozostałych przypadkach (9,6%) stwierdzono wydłużony pasaż jelitowy oraz prawidłowe wymiary bańki odbytnicy. Nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w stężeniach ghreliny i obestatyny w surowicy pomiędzy wyżej opisanymi podgrupami pacjentów z rozpoznaniem zaparciem stolca ( $p>0,05$ ).

#### Korelacje masy ciała, wzrostu i Z-Score BMI

W przeprowadzonym badaniu oceniono również korelacje poszczególnych wyników z danymi antropometrycznymi pacjentów z obu grup. Nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji w grupie kontrolnej pomiędzy masą ciała, wzrostem czy BMI a stężeniami wybranych enterohormonów oraz odpowiednimi receptorami.

W grupie dzieci z zaparciem stolca stwierdzono pozytywną korelację pomiędzy masą ciała i wskaźnikiem BMI a ekspresją mGlu7 w odbytnicy. Identyczne wyniki uzyskano w korelacji wszystkich pacjentów, bez podziału na grupy.

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie korelacji pomiędzy wybranymi zmiennymi a Z-Score BMI. Brak zależności w grupie kontrolnej może wynikać z liczebności grupy, która była zdecydowanie mniejsza niż grupa badana (Tabela 5.).

Tabela 5. Korelacje parametrów antropometrycznych z ekspresją badanych receptorów oraz stężeniami ghreliny i obestatyiny. A – bez podziału na grup, B – w grupie dzieci z zaparciem, C – w grupie kontrolnej.

A. Bez podziału na grupy

|              | GHS-R.S   | GPR39.S   | mGlu7.S   | GHS-R.R   | GPR39.R   | mGlu7.R         | Ghrelina<br>[ng/ml] | Obestatyina<br>[ng/ml] | Stosunek<br>ghrelina/obestatyina |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------|---------------------|------------------------|----------------------------------|
| Masa ciała   | -0,056116 | -0,016380 | -0,079449 | -0,091095 | 0,016405  | <b>0,222297</b> | -0,073842           | 0,055698               | -0,070801                        |
| Wysokość     | -0,012772 | -0,000733 | -0,146371 | -0,062479 | 0,052338  | <b>0,194550</b> | -0,072994           | 0,015223               | -0,039406                        |
| BMI          | -0,067096 | -0,078228 | -0,014017 | -0,085128 | -0,023486 | <b>0,226678</b> | -0,016580           | 0,030393               | -0,013081                        |
| BMI Z- Score | -0,009816 | -0,065012 | 0,021489  | -0,042853 | -0,019367 | 0,164365        | -0,029032           | 0,084933               | -0,054989                        |

B. Grupa dzieci z zaparciem stolca

|             | GHS-R.S   | GPR39S    | mGlu7.S   | GHS-R.R  | GPR39.R   | mGlu7.R         | Ghrelina<br>[ng/ml] | Obestatyina<br>[ng/ml] | Stosunek<br>ghrelina/obestatyina |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------------|---------------------|------------------------|----------------------------------|
| Masa ciała  | -0,068818 | -0,007004 | -0,004233 | 0,058325 | 0,077362  | <b>0,206437</b> | -0,161732           | 0,080045               | -0,078585                        |
| Wysokość    | -0,017991 | 0,005827  | -0,100844 | 0,054259 | 0,118302  | 0,193624        | -0,153038           | 0,043516               | -0,072873                        |
| BMI         | -0,107654 | -0,104928 | 0,037824  | 0,043975 | 0,019059  | <b>0,238700</b> | -0,088871           | 0,048144               | 0,014580                         |
| BMI Z-Score | -0,032663 | -0,064421 | 0,055040  | 0,046532 | -0,006002 | 0,196325        | -0,101827           | 0,128939               | -0,042197                        |

C. Grupa kontrolna

|             | GHS-R.S  | GPR39.S   | mGlu7.S   | GHS-R.R   | GPR39.R   | mGlu7.R   | Ghrelina<br>[ng/ml] | Obestatyina<br>[ng/ml] | Stosunek<br>ghrelina/obestatyina |
|-------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------------------|------------------------|----------------------------------|
| Masa ciała  | 0,095306 | -0,068499 | -0,053431 | -0,127591 | -0,181742 | 0,000129  | -0,218422           | 0,106734               | -0,283231                        |
| Wysokość    | 0,066362 | -0,001997 | -0,063120 | -0,050818 | -0,096361 | 0,002319  | -0,147902           | 0,078578               | -0,179429                        |
| BMI         | 0,096124 | -0,069065 | -0,045955 | -0,228036 | -0,273043 | -0,041203 | -0,171947           | 0,059085               | -0,284850                        |
| BMI Z-Score | 0,065965 | -0,089395 | -0,040238 | -0,251503 | -0,267732 | 0,021513  | -0,021908           | -0,008526              | -0,143246                        |

GHS-R.S - Ekspresja mRNA receptora ghreliny w żołądku, GPR39.S - Ekspresja mRNA obestatyiny w żołądku, mGlu7.S – Ekspresja mRNA receptora glutaminianu w żołądku, GHS-R.R - Ekspresja mRNA receptora ghreliny w odbytnicy, GPR39.R- Ekspresja mRNA receptora ghreliny w odbytnicy, mGlu7.R - Ekspresja mRNA receptora glutaminianu w odbytnicy



## Dyskusja

Zaparcie stolca w przebiegu czynnościowych zaburzeń przewodu pokarmowego jest jednym z największych wyzwań w dziedzinie gastroenterologii dziecięcej. Szacuje się, że czynnościowe zaparcie stolca dotyczy ok. 14,4% dzieci na całym świecie [6]. Największy odsetek dzieci z chorobą zaparciową odnotowuje się w krajach Afrykańskich (31,4%) oraz w Ameryce Północnej (12,1%). W Europie problem ten dotyczy ok. 8,3% dzieci [6]. W populacji osób dorosłych odsetek ludzi cierpiących z powodu zaparcia nie różni się znacząco od populacji pediatrycznej, tj. szacuje się, że dotyczy ok. 14% dorosłych [117]. Przyczyny czynnościowych zaburzeń przewodu pokarmowego są złożone. Na występowanie zaparcia mogą wpływać czynniki genetyczne (dane własne prezentowane ustnie na 52. kongresie ESPGHAN w Glasgow, 2019), behawioralne, immunologiczne, środowiskowe, jak również zawartość błonnika w diecie, czy objętość przyjmowanych płynów. Powstało wiele prac próbujących opisać i wyjaśnić patogenezę tych zaburzeń [68, 72, 118–121], jednak niewiele z tych badań dotyczyło udziału enterohormonów w mechanizmie zaparcia.

Przewlekłe zaparcie stolca może spowodować wielorakie zaburzenia dotyczące nie tylko przewodu pokarmowego, ale również innych układów i narządów.

Długotrwałe zaparcie, które często doprowadza do brudzenia bielizny i niekiedy do nietrzymania mas kałowych, zwłaszcza wśród dzieci uczęszczających do przedszkola i szkoły wiąże się z naganną oceną środowiska. Wysztydzanie i wyśmiewanie przez otoczenie wpływa negatywnie na rozwój psychiczny i socjologiczny dzieci. Udowodniono oddziaływanie choroby zaparciowej na wzrost występowania zaburzeń depresyjnych czy lękowych u dzieci. Często też

obserwuje się współwystępowanie zaburzeń wypróżniania z takimi chorobami jak zaburzenia ze spektrum autyzmu czy ADHD.

Zaparcie stolca często może być związane z innymi chorobami. Może być jednym z objawów alergii na białka mleka krowiego, zwłaszcza IgE-niezależnej, może być zaparcie stolca. W tym wypadku przeprowadzenie, zgodnie z obowiązującymi zaleceniami, próby prowokacyjnej po 2-4 tygodniowym wyłączeniu z diety białek mleka krowiego może okazać się skuteczną metodą leczenia, niewymagającą dodatkowej farmakoterapii [40].

Dysfunkcja przewodu pokarmowego pod postacią choroby zaparciowej może wpłynąć negatywnie na układ moczowy. Zanieczyszczanie się w konsekwencji przewlekłej choroby zaparciowej doprowadza do zwiększonej częstości występowania zakażeń układu moczowego. Postać retencyjna zaparcia wywołuje dysfunkcję pęcherza moczowego polegającą na nietrzymaniu moczu.

W wynikach tej pracy wykazano zarówno większą ekspresję genów receptorów ghreliny w biopsjach błony śluzowej odbytnicy, jak i mniejsze stężenia samej ghreliny w surowicy krwi u dzieci z zaparciem stolca, niż u dzieci w grupie kontrolnej. Podobne wyniki uzyskali Eğritaş Gürkan Ö. i wsp., którzy w swoim badaniu oceniali stężenia ghreliny w surowicy krwi dzieci z zaparciem stolca przed włączeniem, oraz po 2 miesiącach od włączenia leczenia przeciw-zaparciowego [72]. Grupę kontrolną w cytowanej pracy stanowiły dzieci niespełniające kryteriów rozpoznania czynnościowego zaparcia stolca. Autorzy wykazali, że w grupie dzieci z zaparciem, przed włączeniem leczenia obserwowano istotnie statystycznie, niższe stężenia ghreliny w surowicy krwi. Natomiast po 2 miesiącach stosowania właściwego leczenia zanotowano wzrost stężenia ghreliny, niemniej jednak wciąż nie odpowiadał on wyjściowym pomiarom z grupy kontrolnej. Uwagę zwraca mniejsza liczba

badanych pacjentów (43. dzieci) oraz wiek pacjentów włączonych do badania. Autorzy pracy tureckiej skupili się na ocenie dzieci młodszych, od 1 roku życia do 6 lat, stąd mogły wynikać różnice w wynikach w porównaniu z wynikami badań własnych. Mimo to trend w zakresie niższego stężenia ghreliny u dzieci z zaparciem jest taki sam jak w wynikach pracy własnej.

We wcześniej przeprowadzonych badaniach na modelach szczurzych nie wykazano natomiast wpływu ghreliny podawanej dożylnie w dawce 20 ug/kg masy ciała, na czas pasażu przewodu pokarmowego mierzonego metodą izotopu technetu 99-m [122]. Preparat izotopu podawano za pomocą cewnika umieszczonego wcześniej w przewodzie pokarmowym zwierzęcia. Natomiast w badaniu porównującym m.in. działanie ghreliny acylowanej i nieacylowanej na czas pasażu przez jelito grube u szczurów przeprowadzonym przez Hsien-Hao i wsp., wykazano skrócenie czasu pasażu jelitowego u szczurów po podaniu badanych substancji w porównaniu do roztworu 0,9% chlorku sodu jako placebo w próbie kontrolnej [123]. Wynik ten koreluje z wynikami pracy własnej.

Wyższa ekspresja *GHSR* w grupie dzieci z zaparciem może, może być odpowiedzią na niskie stężenia ghreliny w mechanizmie sprzężenia zwrotnego. W dostępnej literaturze medycznej brakuje pracy poświęconych temu zagadnieniu i nie można znaleźć odniesienia do wyników własnych.

W 2014 roku R. V. Pustovit i wsp. opisali eksperyment przeprowadzony na szczurach polegający na podaniu agonisty GHS-R – ulimoreliny [120]. Dawka 0,3-5 mg/kg masy ciała wywołała znaczny wzrost częstości i amplitudy aktywności propulsywnej jelita grubego. Pierwsze efekty badacze zaobserwowali już po  $31,7 \pm 6,7$  s od dożylnego podania leku. Po uszkodzeniu rdzenia kręgowego u badanych zwierząt skuteczność zastosowanej substancji znacząco zmalała, co przemawia za działaniem ośrodkowym ulimoreliny, a nie przez receptory obecne w przewodzie pokarmowym.

Rok później ten sam autor opublikował pracę, w której badany był inny agonista GHS-R, a mianowicie kapromorelina [124]. Podobnie jak poprzednie, badanie polegało na określeniu wpływu tego analogu ghreliny na motorykę jelita grubego poprzez GHS-R. Potwierdzono efekt skutecznego wypróżnienia u zwierząt z zaparciem stolca. Natomiast w tym badaniu nie rozróżniono wpływu agonisty GHS-R na receptory obecne w ośrodkowym układzie nerwowym oraz obwodowe – w jelicie grubym.

W innym badaniu R. V. Pustovit i wsp. udowodnili, że pobudzenie receptorów ghreliny zlokalizowanych w ośrodku defekacji w odcinku lędźwiowo-krzyżowym rdzenia kręgowego wpływa pozytywnie na proces oddania stolca, chociaż nie udało się potwierdzić obecności ghreliny w preparatach rdzenia kręgowego przy użyciu technik immunochemicznych [125]. Z kolei Ferens i wsp. zaobserwowali propulsywne ruchy perystaltyczne jelita grubego trwające do 20 minut po dożylnym podaniu kapromoreliny dożylnie u szczurów z uszkodzonym rdzeniem kręgowym [126]. Ponadto nie wykazano istotnie statystycznych różnic pomiędzy pobudzeniem motoryki jelita grubego u szczurów z uszkodzeniem rdzenia a u szczurów z grupy kontrolnej. Eksperyment ten przemawia za obwodową stymulacją receptorów ghreliny (w jelicie grubym). Ta obserwacja stanowi cenne uzupełnienie drugiego według kolejności opisywania eksperymentu Pustovita i wsp. Te prace eksperymentalne tłumaczą wykrytą przeze mnie zależność pomiędzy ekspresją obwodowego receptora ghreliny w jelicie grubym a zaparciem u dzieci.

W badaniu klinicznym II-fazy przeprowadzonym na 48 zrandomizowanych, dorosłych pacjentach, polegającym na ocenie wpływu analogu ghreliny – relamoreliny na motorykę przewodu pokarmowego wykazano, pozytywny wpływ preparatu na przyspieszenie opróżniania żołądka, perystaltyki jelita cienkiego i jelita grubego po 32h od zastosowaniu substancji [127]. Wyniki te mogą tłumaczyć obserwowane zależności w pracy własnej. Tym

bardziej, że użyty w omawianym badaniu analog ghreliny ma 3-krotnie większe powinowactwo do aktywowania GHS-R niż sama ghrelina, która wykazuje krótki okres działania, więc w warunkach laboratoryjnych nie jest dobrym substratem do tego typu badań. Ponadto potwierdzono wpływ relamoreliny na receptory obecne w jelicie grubym [128], co wyklucza izolowane działanie ośrodkowe podanej substancji.

Wyniki pozostające w opozycji w stosunku do wyżej wymienionych rezultatów badań, opisujących wpływ ghreliny na motorykę jelita grubego, uzyskali James J. i wsp. [129]. Autorzy badali wpływ uromoreliny m.in. na motorykę przewodu pokarmowego u ludzi. Założenie badaczy było poparte wynikami innych badań przeprowadzonych głównie na zwierzętach, u których wykazywano pobudzający wpływ badanej cząsteczki na motorykę żołądka, dwunastnicy oraz jelita grubego. Badanie to zostało przeprowadzone na zdrowych, dorosłych ochotnikach, których losowo przydzielono do dwóch grup, w których zastosowano badaną substancję w dawce 600 ug/kg masy ciała lub placebo. Uczestnikom podawano dożylnie substancję przez 2 dni. Następnie, trzeciego dnia za pomocą badania scyntygraficznego oceniano przemieszczanie spożytego przez nich kwasu dietylenotriaminopentaoctowego znakowanego technetem-99. Wyniki badania nie wykazały istotnego statystycznie wpływu uromoreliny na czas pasażu przez jelito grube. W drugiej części badania wyniki wykazały prokinetyczne działanie uromoreliny na motorykę żołądka i dwunastnicy. Niepowodzenie w osiągnięciu wzmożenia perystaltyki w dolnym odcinku przewodu pokarmowego autorzy tłumaczyli brakiem działania substancji w jelicie grubym. Jako analog receptora substancja ta nie jest identycznie działająca jak ghrelina. Uromorelina w więcej niż 99% jest związana z kwaśną  $\alpha$ -1 glikoproteiną, a swoją aktywność wykazuje wyłącznie wolna frakcja substancji, co również może tłumaczyć różne wyniki wcześniej cytowanych autorów od wyników uzyskanych w tej pracy.

Wyższe wartości wskaźnika stosunku ghreliny do obestatyny w surowicy dzieci z grupy kontrolnej niż u dzieci z zaparciem przemawiają za znaczeniem udziału wzajemnych proporcji enterohormonów w modulowaniu motoryki przewodu pokarmowego. W badaniu własnym wykazano wyższe wartości wskaźnika stosunku ghreliny do obestatyny w grupie kontrolnej w stosunku do dzieci z zaparciem. Obserwacja ta przemawia za dysproporcją w wydzielaniu ghreliny i obestatyny w chorobie zaparciowej u dzieci. Należy podkreślić, iż nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w stężeniach obestatyny pomiędzy dziećmi z obu grup. Różnice te zależą od zmniejszonego wydzielania ghreliny przez komórki enteroendokrynne u dzieci z zaparciem stolca. Nie znaleziono w przeanalizowanej literaturze punktów odniesienia dotyczących omówionego wskaźnika w chorobie zaparciowej u dzieci, natomiast podobne obserwacje opisano u osób z otyłością [130]. Zaobserwowano również, że zaburzenia proporcji stężeń ghreliny w stosunku do obestatyny mogą służyć jako marker nasilenia zapalenia w nieswoistych chorobach zapalnych jelit [131]. Autorzy udokumentowali, że w aktywnej fazie choroby obserwowano istotnie statycznie wyższe stężenia ghreliny w surowicy badanych pacjentów niż u osób zdrowych. Nie odnotowano takich różnic w stężeniu obestatyny, zatem stosunek ghrelina/obestatyna ulega znacznemu podwyższeniu w przypadku aktywnego nieswoistego zapalenia jelit. Wartość pracy ogranicza niska liczba osób badanych (31 przypadków choroby Leśniowskiego-Crohna, 22 przypadki wrzodziejącego zapalenia jelita grubego). Co prawda z badania wykluczono pacjentów z chorobami endokrynologicznymi, które potencjalnie mogą wpływać na stężenie enterohormonów w surowicy, ale dalej grupy pozostawały bardzo heterogenne pod względem innych czynników mogących zaburzać proporcje pomiędzy stężeniami ghreliny i obestatyny – takie jak: wiek pacjentów, czas trwania choroby czy metoda leczenia choroby podstawowej.

Istotne wnioski przedstawili Sedláčková i wsp., którzy w swojej pracy analizowali m.in. stosunek ghreliny do obestatyny w anoreksji oraz bulimii [132]. Autorzy publikacji zaobserwowali znacznie niższe wartości omawianego wskaźnika w surowicy krwi u chorych na bulimię w porównaniu do chorych na anoreksję. Ponadto, badacze wskazali na niższe wartości wskaźnika w obu grupach pacjentów z zaburzeniami odżywiania w stosunku do grupy kontrolnej. Autorzy tej pracy tłumaczyli to zjawisko wyższym wydzielaniem obestatyny u pacjentów z bulimią i anoreksją na skutek zmienionej ekspresji preproghreliny. Natomiast należy wziąć pod uwagę to, że wyniki wyżej opisanej pracy mogą być zaburzone przez wielohormonalne zaburzenia powstałe w przebiegu przewlekłej choroby. W pracy własnej także oceniono korelację pomiędzy wskaźnikiem określającym stosunek ghreliny do obestatyny z BMI i Z-Score BMI pacjentów, zarówno w podziale na grupy, jak i bez podziału. Nie zaobserwowano istotnej statystycznie korelacji pomiędzy Z-Score BMI a stosunkiem ghrelina-obestatyna w poszczególnych grupach oraz wśród wszystkich przebadanych pacjentów. Natomiast należy wziąć pod uwagę, że do badania zostali włączeni tylko nieliczni pacjenci z niską lub wysoką masą ciała, tzn. poniżej 3 i powyżej 97 centyla normy dla wieku. Jako drugi czynnik odróżniający oba badania należy uwzględnić brak oceny stężenia enterohormonów przed i po posiłku.

Dysproporcja w zakresie stężeń obestatyny i ghreliny u dzieci z zaparciem jest powiązana z pochodzeniem obu enterohormonów z jednej cząsteczki prekursorowej. Odpowiednie wariacje splicingowe prekursorowego mRNA dla preproghreliny są zapewne determinowane przez sprzężenie zwrotne wynikające z choroby zaparciowej. Stanowi to podłoże do dalszych poszukiwań oraz badań.

Bülbül M. i wsp. przeprowadzili badanie na szczurach z uszkodzonym genem receptora ghreliny. W celu pomiaru napięcia mięśniówki przewodu pokarmowego u zwierząt

umieszczono przetworniki tensometryczne w żołądku i dwunastnicy [133]. Po dożylnym podaniu ghreliny zaobserwowano istotny wzrost aktywności motorycznej żołądka i dwunastnicy u szczurów z grupy kontrolnej (bezpośrednio po podaniu ghreliny zaobserwowano znaczący wzrost amplitudy skurczów III fazy MMC), natomiast u zwierząt pozbawionych GHS-R nie wykazano jakiegokolwiek wpływu na motorykę. Badanie to dotyczyło wyłącznie górnego odcinka przewodu pokarmowego, jednak ze względu na brak różnic w budowie tych receptorów zarówno w górnym, jak i w dolnym odcinku przewodu pokarmowego należy domniemywać, że pobudzenie tych receptorów przez ghrelinę będzie oddziaływać na motorykę jelita grubego.

Yan Wang i wsp. w przeprowadzonym badaniu również wykazali, że aktywacja receptora dla ghreliny u szczurów, wzmacnia perystaltykę przewodu pokarmowego [134]. Eksperyment ten był przeprowadzony na 36 szczurach podzielonych na odpowiednie grupy w zależności od podawanych substancji. Każde ze zwierząt miało umieszczony cewnik w okolicy jąder przykomorowych podwzgórza, gdzie jest największe skupienie GHS-R, w celu podawania badanej substancji (egzogennej ghreliny, antagonisty GHS-R lub roztworu 0,9% NaCl jako placebo). Następnie po podaniu ghreliny, przez cewnik umieszczony w dwunastnicy podano zwierzętom niewchłaniany barwnik w celu oceny pasażu przewodu pokarmowego.

Wyniki wyżej wymienionych badań bardzo silnie korespondują z danymi uzyskanymi w badaniu własnym. Wskazują na pozytywny wpływ ghreliny na wzmożenie perystaltyki przewodu pokarmowego.

Pozytywna korelacja pomiędzy ekspresją genów receptora ghreliny w biopsjach pobranych z błony śluzowej żołądka oraz stężeniami obestatyny w surowicy krwi prowadzi do stwierdzenia, że wydzielanie obestatyny jest ściśle powiązane z obecnością i prawdopodobnie z aktywnością GHS-R. Nawiązując do wyników innych badaczy, po raz



kolejny wykazano, że obydwa hormony pochodzące z jednej cząsteczki prekursorowej, jak również ich receptory nie mogą być rozpatrywane osobno [125, 133–135].

Na podstawie przeprowadzonej analizy należy podkreślić rolę ghreliny jako enterohormonu biorącego czynny udział w regulowaniu motoryki przewodu pokarmowego. Wyniki badań własnych, potwierdzających znaczenie ghreliny w funkcjonowaniu przewodu pokarmowego, mogą przyczynić się w przyszłości do rozwoju nowych terapii stosowanych zarówno w leczeniu zaparcia stolca, jak innych czynnościowych zaburzeń przewodu pokarmowego.

W przypadku receptora obestatyny również zaobserwowano zwiększoną ekspresję genu receptora w biopsjach błony śluzowej odbytnicy u dzieci z rozpoznaniem zaparciem stolca, a także zaobserwowano istotną statystycznie, pozytywną korelację pomiędzy stężeniem obestatyny w surowicy krwi u dzieci z zaparciem stolca a czasem pasażu przewodu pokarmowego. Można zatem stwierdzić, że wyższe stężenia obestatyny w surowicy proporcjonalnie wpływają na wydłużenie czasu pasażu jelitowego.

Opisywano w literaturze obecność w jelicie grubym komórek produkujących obestatyne, natomiast w przeanalizowanym piśmiennictwie znaleziono tylko jedną pracę, w której badano oddziaływanie obestatyny na motorykę jelita grubego [136].

W 2008 roku Chen i wsp. przeprowadzili doświadczenie na szczurach mające na celu wykazanie i opisanie udziału obestatyny w motoryce przewodu pokarmowego [137]. Zwierzętom umieszczono chirurgicznie cewnik w proksymalnej części okrężnicy, następnie przydzielono je do poszczególnych grup: pierwszą grupę stanowiły szczury, którym podawano dożylnie obestatyne w stężeniu 45 nmol/kg, w drugiej grupie podano dawkę 100 nmol/kg, trzecia grupa szczurów otrzymała obestatyne w dawce 300 nmol/kg. Czwartą grupę stanowiły

zwierzęta, którym podano czynnik uwalniający kortykotropinę (*CRF – ang. corticotropin realising factor*). Ostatnia grupa była to grupa kontrolna, która otrzymała 0,9% NaCl jako placebo. Następnie w każdej grupie po podaniu niewchłanianego ze światła przewodu pokarmowego barwnika, mierzono czas do pojawienia się pierwszego wypróżnienia zawierającego podany wcześniej znacznik. Wyniki badania nie wykazały, aby dożylne podanie obestatyny w porównaniu do placebo wpłynęło istotnie na motorykę dolnej części przewodu pokarmowego u szczurów. Badacze wykazali natomiast pobudzający wpływ CRF na motorykę przewodu pokarmowego. Uzyskane wyniki własne również nie wykazały wpływu obestatyny na spowolnienie ruchów perystaltycznych w zakresie jelita grubego. Natomiast, należy wspomnieć, iż w badaniu Chen i wsp. była testowana jedynie pojedyncza dawka obestatyny, a efekt defekacji (ilość, masa i zawartość wody w masach kałowych) był obserwowany przez jedynie 2 godziny od momentu interwencji. Wydłużenie obserwacji oraz zastosowanie innych (większych) dawek obestatyny mogłoby wykazać inne wyniki. W pracy własnej nie wykazano istotnej statystycznie różnicy stężeń obestatyny u dzieci z rozpoznaną chorobą zaparciową w stosunku do pacjentów z grupy kontrolnej.

Słupecka i wsp. w swoim badaniu na modelach szczurzych założyli hamujący wpływ obestatyny na motorykę jelita cienkiego (dwunastnica i jelito czcze) [138]. Zwierzęta przydzielono losowo do jednej z trzech grup: w pierwszej podawano egzogenną obestatinę doustnie w dawce 125 mmol/kg masy ciała, w drugiej w dawce 250 mmol/kg masy ciała, grupa kontrolna otrzymywała placebo. Wyniki badania wykazały, hamujący wpływ obestatyny na amplitudę skurczów mięśniówki przewodu pokarmowego, zarówno w dwunastnicy jak i w jelicie czczym, w obu grupach szczurów, którym podawano obestatinę w stosunku do grupy kontrolnej.

Wynik tego badania potwierdza hamujący wpływ obestatyny na amplitudę skurczów mięśniówki jelita cienkiego, co może wpływać na motorykę jelita. Jednak autorzy nie oceniali motoryki jelita grubego, co byłoby kluczowe w przypadku rozpatrywania obestatyny jako enterohormonu, który bierze udział w patogenezie choroby zaparciowej.

W doświadczeniu przeprowadzonym przez Moechars D. i wsp., mającym na celu wykazać, że obestatyna jest ligandem dla GPR39, użyto myszy z nieczynnym genem *GPR39* [78]. Wykazano, że zwierzęta pozbawione receptora dla obestatyny, do 16 tygodnia życia miały bardzo podobne przyrosty masy ciała, natomiast po tym czasie aż do zakończenia obserwacji w 81 tygodniu, średnia masa ciała myszy pozbawionych *GPR39* była znacznie większa niż zwierząt z grupy kontrolnej. Potwierdza to udział enterohormonu w etiopatogenezie otyłości. Autorzy badali również opróżnianie żołądka jak i wydalanie mas kałowych. Zaobserwowano znacznie szybsze (-50%) opróżnianie żołądka u zwierząt pozbawionych genu *GPR39*. Szybszy pasaż jelita grubego uzyskano u myszy bez genu *GPR39* niż w grupie kontrolnej (wynik statystycznie istotny). Omawiana zależność może być dowodem na hamujący wpływ receptora GPR39 na motorykę jelita grubego u ssaków.

Wielu innych autorów również opisało hamujący wpływ obestatyny na motorykę przewodu pokarmowego [54, 139]. W pracy własnej wykazano hamujące oddziaływanie wyższego stężenia obestatyny w surowicy krwi na motorykę przewodu pokarmowego u dzieci z zaparciem stolca. Niemniej jednak należy zwrócić uwagę, na to, że wyżej opisywane badania eksperymentalne były przeprowadzone na modelu zwierzęcym, a badanie własne dotyczy dzieci. Ponadto w literaturze opisywane są nowe wyniki badań sugerujące, że to dwuwartościowe jony cynku ( $Zn^{2+}$ ) prawdopodobnie są ligandem dla receptora GPR39, co znacząco zmienia sposób interpretacji udziału tego receptora w powiązaniu z obestatyną w patogenezie choroby zaparciowej u dzieci [83, 140].

Na podstawie analizy wyników pracy własnej oraz danych dostępnych w literaturze w chwili obecnej nie można jednoznacznie określić udziału enterohormonu jakim jest obestatyna, w patogenezie choroby zaparciowej. Wskazana jest kontynuacja badań w tym zakresie ze szczegółowym uwzględnieniem roli jonów cynku, które obecnie wydają się być specyficznym ligandem dla receptora GPR39 wpływającego na motorykę przewodu pokarmowego.

Dotychczas opisywano obecność i działanie receptorów glutaminianu głównie w ośrodkowym układzie nerwowym [141, 142]. Ten aminokwas jest jednym z kluczowych neurotransmiterów ośrodkowym i obwodowym w układzie nerwowym, jak również w enteralnym układzie nerwowym. Obecność swoistych receptorów w przewodzie pokarmowym dla glutaminianu została niejednokrotnie potwierdzona, natomiast wciąż pozostaje przedmiotem badań funkcja poszczególnych znanych receptorów, zarówno jono- i metabotropowych [94, 113]. W przeanalizowanym piśmiennictwie zdecydowana większość autorów ogniskowała swoje zainteresowania na funkcji receptorów jono- i metabotropowych pobudzanych przez glutaminian w chorobach ściśle powiązanych z OUN.

W 1999 roku Janković i wsp. przeprowadzili eksperyment na modelu zwierzęcym, polegający na poddaniu stymulacji wypreparowanych fragmentów przewodu pokarmowego w obecności roztworów glutaminianu i asparaginianu [112]. Badacze wykazali, że kwas glutaminowy oraz asparaginian zastosowane *in vitro* jako substraty dodawane do izotonicznej kąpieli, poprzez specyficzne dla siebie receptory odpowiadają za wytwarzanie tonicznych skurczów w dnie żołądka oraz odbytnicy u szczurów. Takiego zjawiska autorzy nie zaobserwowali w preparatach jelita cienkiego i wstępniacy. Prowadzi to do wniosku, że receptory dla tych związków występują tylko w tych dwóch częściach przewodu

pokarmowego. Autorzy podkreślili, że ich badanie nie wskazuje jednoznacznie, który rodzaj receptorów jest pobudzany (jonotropowe czy metabotropowe). W pracy własnej została potwierdzona ekspresja genów receptorów metabotropowych glutaminianu zarówno w bioptatach pobranych z żołądka jak i z odbytnicy, zgodnie z obserwacją Janković i wsp., stanowi uzasadnienie do badania obecności receptorów w bioptatach pobranych z żołądka i odbytnicy.

Tonq Q i wsp., podczas poszukiwania receptorów metabotropowych z grupy III dla glutaminianu (mGlu4, mGlu6, mGlu7 i mGlu8) w układzie nerwowym przewodu pokarmowego ssaków, udowodnili, że oddziaływanie na te receptory pobudza motorykę przewodu pokarmowego [94]. Było to pierwsze badanie, które wykazało mRNA dla receptorów metabotropowych glutaminianu z grupy III w preparatach przewodu pokarmowego szczurów, myszy, świnek morskich oraz ludzi. W badaniu potwierdzono ekspresję genów za pomocą Western blot. Badacze również udowodnili *in vitro*, że pobudzenie receptorów metabotropowych dla glutaminianu z grupy III, podczas stymulowania wycinków jelita w polu elektrycznym prowokuje przyspieszenie pasażu przez skurcze mięśniówki podłużnej w preparatach jelita grubego świnek morskich. Wyniki pracy własnej odpowiadają wynikom powyższej publikacji, co przemawia za udziałem receptorów metabotropowych dla glutaminianu w modulowaniu perystaltyki przewodu pokarmowego.

Jedną z niewielu prac opisujących działanie receptora metabotropowego 7 dla glutaminianu w jelicie grubym ssaków była praca Julio-Pieper i wsp. [115]. Badanie polegało na podaniu doustnym swoistego agonisty dla mGlu7 (AMN082) myszom podzielonym na trzy grupy (mniejsza – 3mg/kg, większa dawka substancji badanej – 6mg/kg oraz placebo, którym była 0,5% zawiesinę metylocelulozy). U zwierząt, którym podano AMN082 masy kałowe wydalone na skutek stresu (umieszczono zwierzęta w specjalnych klatkach z przedziałami)

zawierały w swoim składzie znacząco więcej wody niż stolec wydany przez myszy z grupy kontrolnej. Autorzy w wynikach swojego eksperymentu wykazali, że aktywacja mGlu7 przez selektywnego agonistę tego receptora silnie indukuje wydzielanie wody do światła jelita grubego, co sprzyja wypróżnieniu.

Ponadto w badaniu *in vitro* autorzy udowodnili, że dodanie agonisty mGlu7 do analogu acetylocholino bardziej pobudza perystaltykę wypreparowanej błony śluzowej i podśluzowej jelita grubego niż standardowe pobudzenie receptorów cholinergicznyc. Proces zachodzi w mechanizmie sekrecji jonów do światła przewodu pokarmowego w szlaku zależnym od  $Ca^{2+}$ . Wzmocniona sekrecja jonów do światła przewodu pokarmowego wiąże się ze wzrostem osmolarności treści jelitowej, co wzmacnia przechodzenie cząsteczek wody do jelita. Doświadczenie dowodzi, że glutaminian moduluje motorykę przewodu pokarmowego.

Inny eksperyment, badający działanie receptorów metabotropowych 7 w czynnościowych zaburzeniach przewodu pokarmowego, został opisany przez Shao L. i wsp. [143]. Badanie zostało przeprowadzone na szczurach podzielonych na trzy grupy: grupa kontrolna, zwierzęta wcześnie oddzielone od matki oraz zwierzęta wcześnie oddzielone od matki, którym podawano swoisty ligand dla metabotropowego receptora 7 glutaminianu (AMN082). Za pomocą stopniowo napełnianego balona lateksowego umieszczonego w odbytnicy zwierząt oraz obserwacji zwierząt odnotowywano nadwrażliwość trzewną poszczególnych zwierząt. Po uśmierceniu zwierząt pobrano wycinki jelita grubego w których oceniano m.in. RNA dla mGlu7 z potwierdzeniem obecności białek w technice Western blot. W wynikach wykazano większą nadwrażliwość wisceralną u szczurów wcześnie oddzielonych od matek w stosunku do zwierząt z grupy kontrolnej, przez co wytworzono model imitujący nadwrażliwość trzewną obserwowaną w IBS. Badacze udowodnili, że pobudzanie mGlu7 przez zastosowanie AMN082 wpływa supresyjnie na nadwrażliwość trzewną. Ponadto

potwierdzono zwiększoną ekspresję genu receptora mGlu7 u zwierząt z nadwrażliwością trzewną, co współgra z wynikami Julio-Pieper [115].

W wynikach pracy własnej, wykazano wyższą ekspresję mGlu7 w bioptatach pobranych z żołądka u dzieci z zaparciem niż w grupie kontrolnej. Natomiast niższa ekspresja receptorów była obecna w bioptatach pobranych z odbytnicy. Uzyskane rezultaty u dzieci są zgodne z obserwacjami omówionych powyżej eksperymentów przeprowadzonych na zwierzętach. Większa liczba receptorów w przewodzie pokarmowym wiąże się z nasileniem efektu działania ich agonisty. W przypadku dzieci z zaparciem stolca w pracy własnej odnotowano istotnie mniejszą ekspresję mGlu7, czym można by wytłumaczyć brak adekwatnej odpowiedzi na działanie neurotransmitera – glutaminianu.

Badania przeprowadzone w pracy własnej są pierwszymi, które opisują jednocześnie udział ghreliny, obestatyny oraz ich receptorów w patogenezie czynnościowego zaparcia stolca u dzieci. Ponadto są to pionierskie badania, które wykazały udział receptorów metabotropowych 7 dla glutaminianu w motoryce przewodu pokarmowego u ludzi. Na podstawie wyników własnych można potwierdzić tezę o istotnej roli ghreliny, obestatyny i glutaminianu w patogenezie przewlekłego zaparcia stolca u dzieci. W przedstawionych wynikach badań ghrelina i jej receptor (GHS-R) okazały się silnymi modulatorami wzmagającymi perystaltykę dolnego odcinka przewodu pokarmowego. Z kolei zaobserwowano istotnie większą obecność mRNA receptora obestatyny (GPR39) w błonie śluzowej odbytnicy u dzieci z zaparciem stolca niż w grupie kontrolnej, co przemawia za udziałem GPR39 w patogenezie choroby zaparciowej. Pozostaje to w zgodzie z obserwacją udziału obestatyny w wydłużaniu czasu pasażu jelitowego. Wątpliwość jednak budzą doniesienia dotyczące roli jonów  $Zn^{2+}$  w aktywacji tego receptora. Doniesienia te ujawniają

pole do dalszych badań nad receptorem uwzględniając cynk i obestatyne jako ligandy dla GPR39. Pojedyncze prace wskazują na współdziałanie cynku i obestatyny w aktywacji tego receptora [80].

W biopsjach z błony śluzowej odbytnicy u dzieci z zaparciem stolca zanotowano zdecydowanie niższe średnie wartości ekspresji receptorów metabotropowych 7 dla glutaminianu w porównaniu do grupy kontrolnej.



## Wnioski

1. Na podstawie wyników badania stężenia ghreliny (istotnie niższe stężenie ghreliny u dzieci z zaparciem niż w grupie kontrolnej oraz silna negatywna korelacja stężenia ghreliny z czasem pasażu jelitowego) wykazano prokinetyczną rolę ghreliny dla żołądka i jelita u dzieci.
2. Pomimo, że nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu obestatyny u dzieci w grupie badanej i kontrolnej, dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem obestatyny w surowicy a czasem pasażu jelitowego u dzieci z zaparciem przemawia za hamującą rolą obestatyny w zakresie pasażu treści przez przewód pokarmowy.
3. Stosunek stężeń ghreliny do obestatyny jest znacząco wyższy u dzieci z chorobą zaparciową niż w grupie kontrolnej, co pozwala na spekulację co do różnicy w wariantach splicingowych cząsteczki preproghreliny u pacjentów z zaparciem.
4. Istotnie statystycznie obniżona ekspresja genu receptora metabotropowego 7 w błonie śluzowej odbytnicy u dzieci z chorobą zaparciową w stosunku do grupy kontrolnej przemawia za udziałem tego receptora w regulowaniu motoryki przewodu pokarmowego.
5. W pracy potwierdzono złożoność mechanizmów czynnościowego zaparcia stolca u dzieci, polegającą na spowolnieniu pasażu jelitowego (*colonic inertia*), na retencji stolca (*outlet obstruction*) oraz postaci mieszanej. Nie odnotowano wpływu badanych enterohormonów na poszczególne postaci zaparcia. Jednak rozpoznanie typu zaparcia stolca jest istotne, gdyż determinuje wybór odpowiedniej terapii (np. leki prokinetyczne z makrogole, same makrogole lub tylko leki prokinetyczne).

## Streszczenie

Zaparcie jest jednym z najczystszych problemów gastroenterologicznych z którymi spotykają się pediatrzy na całym świecie. Szacuje się, że dotyczy nawet 37% dzieci [4, 5]. Przeważającą część stanowią czynnościowe zaburzenia przewodu pokarmowego, a tylko 5% ma uwarunkowania organiczne. Zaparcie u dzieci pojawia się często podczas tzw. treningu korzystania z toalety, czyli pomiędzy 2. a 4. rokiem życia i dotyczy głównie chłopców [7].

Czynnościowe zaparcie stolca rozpoznaje się na podstawie Kryteriów Rzymskich, w tej pracy zostały wykorzystane obowiązujące w trakcie przeprowadzania badania Kryteria Rzymskie III.

Dotychczas w literaturze pojawiały się badania dotyczące roli enterohormonów w patogenezie zaparcia stolca, zdecydowana większość z tych badań była przeprowadzona na modelach zwierzęcych lub dotyczyła populacji osób dorosłych [50, 51]. Nie przeprowadzono dotychczas badań wyjaśniających relacje enterohormonów z patogenezą czynnościowego zaparcia stolca u dzieci.

Ghrelina wykazuje duże podobieństwo w budowie cząsteczki do motyliny, zaobserwowano podobieństwo w zakresie budowy receptorów dla obydwu enterohormonów. Z tego powodu stała się ona przedmiotem badań nad wpływem na motorykę przewodu pokarmowego. W toku badań wykazano, że ghrelina skutecznie pobudza kompleks motoryczny jelita oraz przyspiesza opróżnianie żołądka [68, 69]. Receptorem dla ghreliny jest GHS-R (receptor uwalniający hormon wzrostu) [56, 60].

Pierwsze opisy działania cząsteczki obestatyny jednomyślnie wskazywały na opozycyjne działanie w stosunku do cząsteczki ghreliny, tj. opóźnienie opróżniania żołądka, zmniejszenie przyjmowania pokarmów oraz obniżenie przyrostu masy ciała [81].

Domniemanym receptorem dla obestatyny jest receptor 39 powiązany z białkiem G (*GPR39 - ang. G protein-coupled receptor 39*).

W 2010 r. Julio-Pieper i wsp. opisali aktywność metabotropowych receptorów 7 dla glutaminianinu w jelicie grubym u myszy. Wyniki przeprowadzonego badania wykazały wysoką ekspresję *mGlu7* w błonie śluzowej jelita grubego myszy. Ponadto badacze udokumentowali, iż aktywacja receptorów *mGlu7* znacząco zwiększała *in vivo* zawartość wody w kale, co ma znaczenie przeciwwzparciowe. Eksperyment ten potwierdza funkcjonalne znaczenie ekspresji mRNA receptorów *mGlu7* w okrężnicy [115].

Celem pracy było ustalenie udziału ghreliny i obestatyny oraz ich receptorów, a także receptora metabotropowego 7 dla glutaminianu w patogenezie przewlekłego czynnościowego zaparcia u dzieci.

Do badania zostało włączonych 150. pacjentów (114. dzieci z zaparciem oraz 36. dzieci bez zaparcia, prezentujących zaburzenia z koniecznością różnicowania z organicznymi przyczynami chorób). U wszystkich pobrano surowicę krwi w celu oceny stężenia ghreliny i obestatyny oraz przeprowadzono gastroskopię i sigmoidoskopię w celu pobrania bioptatów z żołądka i odbytnicy do oceny ekspresji mRNA receptorów ghreliny, obestatyny i metabotropowego 7 glutamianu.

Stwierdzono istotne statystycznie niższe stężenia ghreliny w osoczu dzieci z zaparciem stolca w stosunku do dzieci z grupy kontrolnej (1,9 ng/ml vs. 2,6 ng/ml,  $p < 0,05$ ). W grupie dzieci z zaparciem zaobserwowano negatywną korelację pomiędzy stężeniem ghreliny a czasem pasaży jelitowego.

Nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w medianach wartości stężeń obestatyny pomiędzy grupami ( $p = 0,297$ ). Potwierdzono niższy stosunek wartości stężeń

ghreliny do obestatyny u pacjentów z zaparciem stolca w porównaniu do pacjentów z grupy kontrolnej (72,83 vs. 129,58,  $p=0,01$ ).

Stwierdzono wyższe średnie wartości ekspresji mRNA receptorów dla mGlu7 w biopsjach pobranych z błony śluzowej żołądka dzieci z zaparciem stolca niż u dzieci bez zaparcia (32,28 vs. 31,44,  $p=0,03$ ), natomiast w biopsjach pobranych z błony śluzowej odbytnicy zaobserwowano odwrotną zależność, tj. znacznie niższe wartości ekspresji u pacjentów z zaparciem stolca w porównaniu do grupy kontrolnej (31,2 vs. 32,4,  $p<0,05$ ).

Zaobserwowano wyższe średnie wartości ekspresji mRNA receptora dla ghreliny w biopsjach pobranych z odbytnicy dzieci z zaparciem stolca, w porównaniu do grupy kontrolnej (29,35 vs. 28,25,  $p<0,05$ ).

W grupie dzieci z rozpoznaniem zaparciem stolca stwierdzono u ponad połowy pacjentów (64,9%) poszerzenie bańki odbytnicy oraz zwolniony pasaż jelitowy. U ¼ badanych dzieci (25,4%) zaobserwowano poszerzoną bańką odbytnicy z prawidłowym pasażem jelitowym, w pozostałych przypadkach (9,6%) stwierdzono wydłużony pasaż jelitowy oraz prawidłowe wymiary bańki odbytnicy.

Na podstawie wyników badania stężenia ghreliny (istotnie niższe stężenie ghreliny u dzieci z zaparciem niż w grupie kontrolnej oraz silna negatywna korelacja stężenia ghreliny z czasem pasaży jelitowego) wykazano prokinetyczną rolę ghreliny dla żołądka i jelita u dzieci.

Pomimo, że nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu obestatyny u dzieci w grupie badanej i kontrolnej, dodatnia korelacja pomiędzy stężeniem obestatyny w surowicy a czasem pasaży jelitowego u dzieci z zaparciem przemawia za hamującą rolę obestatyny w zakresie pasaży treści przez przewód pokarmowy.

Istotnie statystycznie obniżona ekspresja genu receptora metabotropowego 7 w błonie śluzowej odbytnicy u dzieci z chorobą zaparciową w stosunku do grupy kontrolnej przemawia za udziałem tego receptora w regulowaniu motoryki przewodu pokarmowego.

W pracy potwierdzono złożoność mechanizmów czynnościowego zaparcia stolca u dzieci, polegającą na spowolnieniu pasażu jelitowego (*colonic inertia*), na retencji stolca (*outlet obstruction*) oraz postacię mieszaną. Nie odnotowano wpływu badanych enterohormonów na poszczególne postaci zaparcia.

## Abstract

Constipation is one of the most frequent gastrointestinal disorders among children in the world. It is estimated that it can affect up to 37% of children [4,5]. The most common reason of constipation are functional disorders and only 5% has organic reason. Constipation in children often occurs during toilet training, between the ages of 2 and 4 and concerns mainly boys [7].

Functional constipation is diagnosed on the basis of the Rome Criteria, in this study the Rome III Criteria were used.

Studies, which have appeared in the literature, on the role of enterohormones in the pathogenesis of constipation, in major were conducted on animal models or concerned the adult population [50,51]. No studies have been conducted to explain the relationship between enterohormones and the pathogenesis of functional constipation in children.

Ghrelin reveals a great similarity in the structure of the molecule to motilin. Also similarity in the construction of receptors for both enterohormones has been observed. For this reason, it has become the subject of research on the effect on the motility of the gastrointestinal tract. In that research, it was shown that ghrelin effectively stimulates the motor complex of the intestine and accelerates gastric emptying [68, 69]. The receptor for ghrelin is GHS-R (growth hormone releasing receptor) [56,60].

The first descriptions of the effect of the obestatin molecule unanimously pointed to an opposing effect in relation to the ghrelin molecule [81], i.e. delayed gastric emptying, reduced food intake and decreased body weight gain. The putative receptor for obestatin is G protein-coupled receptor 39 (GPR39).

In 2010, Julio-Pieper et al. reported the activity of metabotropic 7 receptors for glutamate in the large intestine of mice. The results of the study showed high expression of mGlu7 in the large intestine mucosa of mice. In addition, researchers documented that activation of mGlu7 receptors significantly increased water content in the feces in vivo, which has anti-constipation properties. This experiment confirms the functional importance of mGlu7 receptor mRNA expression in the colon [115].

The aim of the study was to determine the role of ghrelin and obestatin and their receptors, as well as the metabotropic glutamate receptor 7 in the pathogenesis of chronic functional constipation in children.

150 patients were included in the study (114 children with constipation and 36 children without constipation, presenting disorders with the need to differentiate with organic causes of diseases). In all patients, blood serum was collected to assess the concentration of ghrelin and obestatin, and gastroscopy and sigmoidoscopy were performed to collect gastric and rectal biopsies to assess mRNA expression of ghrelin, obestatin and metabotropic 7-glutamate receptors.

Statistically significant lower concentrations of ghrelin in the plasma of children with constipation were found in comparison to children from the control group (1.9 ng/ml vs. 2.6 ng/ml,  $p < 0.05$ ). In the group of children with constipation, a negative correlation between ghrelin concentration and intestinal transit time was observed.

There was no statistically significant difference in median obestatin levels between the groups ( $p = 0.297$ ). A lower ratio of ghrelin to obestatin concentrations was confirmed in patients with constipation compared to patients in the control group (72.83 vs. 129.58,  $p = 0.01$ ).

Higher mean values of mGlu7 receptor mRNA expression were found in biopsies from the gastric mucosa of children with constipation than in children without constipation (32.28 vs. 31.44,  $p=0.03$ ), while in biopsies from the rectal mucosa an inverse relationship was observed - significantly lower expression values in patients with constipation compared to the control group (31.2 vs. 32.4,  $p<0.05$ ).

Higher mean ghrelin receptor mRNA expression values were observed in rectal biopsies of children with constipation compared to the control group (29.35 vs. 28.25,  $p<0.05$ ).

In the group of children diagnosed with constipation, more than half of the patients (64.9%) had dilation of the rectal ampulla and slowed intestinal transit. In  $\frac{1}{4}$  of the examined children (25.4%) a dilated rectal ampulla with normal intestinal passage was observed, in the remaining cases (9.6%) an extended intestinal passage and correct dimensions of the rectal ampulla were observed.

Based on the results of the ghrelin concentration test (significantly lower ghrelin concentration in children with constipation than in the control group and a strong negative correlation of ghrelin concentration with intestinal transit time), the prokinetic role of ghrelin for the stomach and intestine in children was demonstrated.

Although there was no statistically significant difference in the concentration of obestatin in children in the study and control groups, the positive correlation between the concentration of obestatin in the serum and the intestinal transit time in children with constipation supports the inhibitory role of obestatin in the passage of content through the gastrointestinal tract.

Statistically significantly reduced expression of the metabotropic receptor 7 gene in rectal mucosa in children with constipation disease in relation to the control group supports the participation of this receptor in the regulation of gastrointestinal motility.



The study confirmed the complexity of the mechanisms of functional constipation in children, consisting in slowing down the intestinal transit (*colonic inertia*), stool retention (*outlet obstruction*) and a mixed form. There was no effect of the tested enterohormones on particular forms of constipation.

## Wykaz rycin i tabel

### Rysunki:

|   |    |
|---|----|
| Rysunek 1. Schemat procesu włączenia pacjentów do udziału w badaniu. ....   | 35 |
| Rysunek 2. Porównanie stężenia ghreliny w osoczu pacjentów z grupy kontrolnej oraz grupy badanej. ....  | 44 |
| Rysunek 3. Porównanie stężenia obestatyiny w osoczu pacjentów z grupy kontrolnej oraz z grupy badanej. ....   | 45 |
| Rysunek 4. Porównanie ekspresji mRNA dla receptorów mGlu7 grupa kontrolna vs. pacjenci z chorobą zaparciową: A. w biopsatach z żołądka, B.W biopsatach z odbytnicy..... | 47 |
| Rysunek 5. Porównanie ekspresji mRNA dla receptorów ghreliny w odbytnicy.....   | 48 |
| Rysunek 6. Porównanie średnicy bańki odbytnicy w obu grupach pacjentów. ....  | 49 |
| Rysunek 7. Korelacja stężenia ghreliny z czasem pasażu jelitowego. ....   | 50 |
| Rysunek 8. Korelacja stężenia obestatyiny z czasem pasażu jelitowego. ....  | 51 |
| Rysunek 9. Korelacja średnicy bańki odbytnicy z czasem pasażu jelitowego. ....  | 54 |
| Rysunek 10. Porównanie średnicy bańki odbytnicy u dzieci z prawidłowym i wydłużonym czasem pasażu jelitowego. ....  | 54 |

Tabele:

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Charakterystyka zbadanej populacji.....  | 43 |
| Tabela 2. Stężenia ghreliny i obestatyny w obu grupach.....  | 46 |
| Tabela 3. Ekspresja mRNA receptorów ghreliny, obestatyny oraz receptora<br>metabotropowego 7 dla glutaminianu. ....  | 48 |
| Tabela 4. Korelacje czasu pasażu jelitowego, ekspresji badanych receptorów oraz stężenia<br>badanych enterohormonów. ....  | 52 |
| Tabela 5. Korelacje parametrów antropometrycznych z ekspresją badanych receptorów oraz<br>stężeniami ghreliny i obestatyny. A – bez podziału na grup, B – w grupie dzieci z zaparciem, C<br>– w grupie kontrolnej..... | 56 |

## Bibliografia

1. Constipation in children and young people. NICE Clinical Guidelines, No. 99, London 2017 Jul. ISBN-13: 978-1-4731-2521-6 [www.nice.org.uk/guidance/cg99](http://www.nice.org.uk/guidance/cg99)
2. Belsey J., Greenfield S., Candy D., Geraint M. Systematic review: Impact of constipation on quality of life in adults and children. Vol. 31, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2010. 938–49. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04273.x
3. Sommers T., Corban C., Sengupta N., Jones M., Cheng V., Bollom A., Nurko S., Kelley J., Lembo A. Emergency Department Burden of Constipation in the United States from 2006 to 2011. *American Journal of Gastroenterology*. 2015. Apr;110(4):572–9. doi: 10.1038/ajg.2015.64
4. Caroline R. Paul C.M.W. *Nelson Essentials of Pediatrics*. Elsevier; 2018. p. 41–58. ISBN: 9780323528078
5. Robin S.G., Keller C., Zwiener R., Hyman P.E., Nurko S., Saps M., Di Lorenzo C., Shulman R., Hyams J., Palsson O., Tilburg M. Prevalence of Pediatric Functional Gastrointestinal Disorders Utilizing the Rome IV Criteria. *J Pediatr*. 2018 Apr 1;195:134–9. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.12.012
6. Tran D.L., Sintusek P. Functional constipation in children: What physicians should know. *World J Gastroenterol* 2023 Feb 2;29(8):1261. doi: 10.3748/wjg.v29.i8.1261
7. Ryżko J. III klasyfikacja rzymska zaburzeń czynnościowych przewodu pokarmowego okresu dziecięcego i młodzieńczego. *Prz Gastroenterol*. 2008;3(2):79–86.
8. Kwiecień J. Kryteria Rzymskie IV (2016) – aktualne wytyczne rozpoznawania i leczenia czynnościowych zaburzeń przewodu pokarmowego u dzieci. *Standardy Medyczne* 2016; t.13:597-605
9. Tabbers M.M., Di Lorenzo C., Berger M.Y., Faure C., Langendam M.W., Nurko S., Staiano A., Vandenplas Y., Beninga M. Evaluation and treatment of functional

- constipation in infants and children: evidence-based recommendations from ESPGHAN and NASPGHAN. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014 Feb; 58(2):258–74. doi: 10.1097/MPG.0000000000000266
10. Van Ginkel R., Reitsma J.B., Büller H.A., Van Wijk M.P., Taminiau J.A.J.M., Benninga M.A. Childhood constipation: longitudinal follow-up beyond puberty. *Gastroenterology.* 2003 Aug;125(2):357–63. doi: 10.1016/s0016-5085(03)00888-6
  11. Foong D., Zhou J., Zarrouk A., Ho V., O'Connor M.D. Understanding the Biology of Human Interstitial Cells of Cajal in Gastrointestinal Motility. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 1; 21(12):1–18. doi: 10.3390/ijms21124540
  12. Komuro T. Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *Journal of Physiology.* 2006 Nov;576(3):653–8. doi: 10.1113/jphysiol.2006.116624
  13. Szurszewski J.H. A migrating electric complex of canine small intestine. *Am J Physiol.* 1969;217(6):1757–63. doi: 10.1152/ajplegacy.1969.217.6.1757
  14. Palit S., Lunniss P.J., Scott S.M. The Physiology of Human Defecation. *Dig Dis Sci.* 2012 Jun 26;57(6):1445–64. doi: 10.1007/s10620-012-2071-1
  15. Scott S.M. Manometric techniques for the evaluation of colonic motor activity: Current status. *Neurogastroenterol Motil.* 2003;15(5):483–513. doi: 10.1046/j.1365-2982.2003.00434.x
  16. Narducci F., Bassotti G., Gaburri M., Morelli A. Twenty four hour manometric recording of colonic motor activity in healthy man. *Gut.* 1987 Jan 1;28(1):17–25. doi: 10.1136/gut.28.1.17
  17. Camilleri M., Bharucha E., Di Lorenzo C., Hasler W.L., Prather C.M., Rao S.S., Wald A. American Neurogastroenterology and Motility Society consensus statement on intraluminal measurement of gastrointestinal and colonic motility in clinical practice. *Neurogastroenterol Motil.* 2008 Dec 1;20(12):1269–82. doi: 10.1111/j.1365-2982.2008.01230.x
  18. Brookes S.J., Dinning P.G., Gladman M.A. Neuroanatomy and physiology of colorectal function and defaecation: From basic science to human clinical studies. *Neurogastroenterol Motil.* 2009;21(SUPPL. 2):9–19. doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01400.x

19. Rao S.S.C., Sadeghi P., Beaty J., Kavlock R., Ackerson K. Ambulatory 24-h colonic manometry in healthy humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;280(4 43-4):629–39. doi: 10.1152/ajpgi.2001.280.4.G629
20. Dinning P.G., Szczesniak M.M., Cook I.J. Twenty-four hour spatiotemporal mapping of colonic propagating sequences provides pathophysiological insight into constipation. *Neurogastroenterol Motil.* 2008;20(9):1017–21. doi: 10.1111/j.1365-2982.2008.01147.x
21. Kumar D., Williams N.S., Waldron D., Wingate D.L. Prolonged manometric recording of anorectal motor activity in ambulant human subjects: Evidence of periodic activity. *Gut.* 1989;30(7):1007–11. doi: 10.1136/gut.30.7.1007
22. Bassotti G., de Roberto G., Castellani D., Sediari L., Morelli A. Normal aspects of colorectal motility and abnormalities in slow transit constipation. *World J Gastroenterol.* 2005 May 14;11(18):2691–6. doi: 10.3748/wjg.v11.i18.2691
23. Di Lorenzo C., Flores A.F., Hyman P.E. Age-related changes in colon motility. *J Pediatr.* 1995;127(4):593–6. doi: 10.1016/s0022-3476(95)70120-6
24. Lestar B., Penninckx F., Kerremans R. The composition of anal basal pressure - An in vivo and in vitro study in man. *Int J Colorectal Dis.* 1989;4(2):118–22. doi: 10.1007/BF01646870
25. Miller R., Lewis G.T., Bartolo D.C., Cervero F., Mortensen N.J. Sensory discrimination and dynamic activity in the anorectum: Evidence using a new ambulatory technique. *Br J Surg.* 1988;75(10):1003–7. doi: 10.1002/bjs.1800751018
26. Dinning P.G., Bampton P.A., Andre J., Kennedy M.L., Lubowski D.Z., King D.W., Cook I.J. Abnormal predefecatory colonic motor patterns define constipation in obstructed defecation. *Gastroenterology.* 2004 Jul;127(1):49–56. doi: 10.1053/j.gastro.2004.03.066
27. Bharucha A.E., Klingele C.J. Autonomic and Somatic Systems to the Anorectum and Pelvic Floor. *Peripheral Neuropathy.* 2005;1:279–98. ISBN 9780721694917
28. Broens P.M., Penninckx F.M., Lestár B., Kerremans R.P. The trigger for rectal filling sensation. *Int J Colorectal Dis.* 1994;9(1):1–4. doi: 10.1007/BF00304291

29. Harraf F., Schmulson M., Saba L., Niazi N., Fass R., Munakata J., Diehl D., Mertz H., Naliboff B., Mayer E.A. Subtypes of constipation predominant irritable bowel syndrome based on rectal perception. *Gut*. 1998;43(3):388–94. doi: 10.1136/gut.43.3.38
30. Lynn P.A., Olsson C., Zagorodnyuk V., Costa M., Brookes S.J.H. Rectal intraganglionic laminar endings are transduction sites of extrinsic mechanoreceptors in the guinea pig rectum. *Gastroenterology*. 2003;125(3):786–94. doi: 10.1016/s0016-5085(03)01050-3
31. Frenckner B., Ihre T. Influence of autonomic nerves on the internal and sphincter in man. *Gut*. 1976 Apr;17(4):306–12. doi: 10.1136/gut.17.4.306
32. Petros P., Swash M. The Musculo-Elastic Theory of anorectal function and dysfunction. *Pelvipерineology*. 2008;27:89-93
33. Bellini M., Tonarelli S., Barracca F., Rettura F., Pancetti A., Ceccarelli L., Ricchiuti A., Costa F., De Bortoli N., Marchi S., Rossi A, Chronic Constipation: Is a Nutritional Approach Reasonable? *Nutrients*. 2021 Oct 1;13(10). doi: 10.3390/nu13103386
34. Abu-Ras W., Burghul M., Decker E. Mental health issues is common, resiliency is rare: Qataris and residents' experiences with distress, traumatic symptoms, and coping during the blockade. Gopichandran V, editor. *PLOS glob public health*. 2023 Apr 19;3(4):e0001804. doi: 10.1371/journal.pgph.0001804
35. Tam Y.H., Li A.M., So H.K., Shit K.Y., Pang K.K., Wong Y.S., Tsui S.Y., Mou J.W., Chan K.W., Lee K.H. Socioenvironmental factors associated with constipation in Hong Kong children and Rome III Criteria. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012 Jul;55(1):56–61. doi: 10.1097/MPG.0b013e31824741ce
36. Yamada M., Sekine M., Tatsuse T. Psychological Stress, Family Environment, and Constipation in Japanese Children: The Toyama Birth Cohort Study. *J Epidemiol*. 2019 Jun 1;29(6):220–6. doi: 10.2188/jea.JE20180016
37. Niu Y., Liu T., Ran N., Li K., Sun Y., Wang X., Guo K., Yang X. Relationship between family-related factors and functional constipation among Chinese preschoolers: a case–control study. *BMC Pediatr*. 2022 Dec 1;22(1). doi: 10.1186/s12887-022-03521-w

38. Yamada M., Sekine M., Tatsuse T., Fujimura Y. Lifestyle, psychological stress, and incidence of adolescent constipation: results from the Toyama birth cohort study. *BMC Public Health*. 2021 Dec 1;21(1). doi: 10.1186/s12889-020-10044-5
39. Kim J.Y., Lim M.H. Psychological factors to predict chronic diarrhea and constipation in Korean high school students. *Medicine*. 2021 Jul 7;100(27). doi: 10.1097/MD.00000000000026442
40. Connor F., Salvatore S., D’Auria E., Baldassarre M.E., Acunzo M., Di Bella G., Farella I., Sestito S., Pensabene L. Cows’ Milk Allergy-Associated Constipation: When to Look for It? A Narrative Review. *Nutrients*. 2022 Mar 1;14(6). doi: 10.3390/nu14061317
41. Borowitz S.M., Cox D.J., Tam A., Ritterband L.M., Sutphen J.L., Penberthy J.K. Precipitants of constipation during early childhood. *J Am Board Fam Pract*. 2003;16(3):213–8. doi: 10.3122/jabfm.16.3.213
42. Li H.J., Ray S.K., Singh N.K., Johnston B., Leiter A.B. Basic helix-loop-helix transcription factors and enteroendocrine cell differentiation. *Diabetes Obes Metab*. 2011 Oct;13:5–12. doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01438.x
43. Pearse A.G. The calcitonin secreting C cells and their relationship to the APUD cell series. *J Endocrinol*. 1969 Sep;45(1):Suppl:13-4.
44. Janssen S., Depoortere I. Nutrient Sensing in the Gut: New Roads to Therapeutics? *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24(2). doi: 10.1016/j.tem.2012.11.006
45. Sternini C., Anselmi L., Rozengurt E. Enteroendocrine cells: a site of ‘taste’ in gastrointestinal chemosensing. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2008 Feb;15(1):73–8. doi: 10.1097/MED.0b013e3282f43a73
46. Rehfeld J.F. A Centenary of Gastrointestinal Endocrinology. *Hormone and Metabolic Research*. 2004 Nov 18;36(11/12):735–41. doi: 10.1055/s-2004-826154
47. Lewin K.J. The endocrine cells of the gastrointestinal tract. The normal endocrine cells and their hyperplasias. Part I. *Pathol Annu*. 1986 Jan 1;21 Pt 1:1–27.



48. Gunawardene A.R., Corfe B.M., Staton C.A. Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *Int J Exp Pathol.* 2011;92(4):219. doi: 10.1111/j.1365-2613.2011.00767.x
49. Gribble F.M., Reimann F. Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2019 Apr 13;15(4):226–37. doi: 10.1038/s41574-019-0168-8
50. Koutouratsas T., Kalli T., Karamanolis G., Gazouli M. Contribution of ghrelin to functional gastrointestinal disorders' pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2019 Feb 7;25(5):539–51. doi: 10.3748/wjg.v25.i5.539
51. Saliakellis E., Karatzas N., Iakovou I., Farmaki E., Varlamis G., Fotoulaki M. Serum levels of ghrelin and obestatin in children with symptoms suggestive of delayed gastric emptying of unclear etiology. *Ann Gastroenterol.* 2015;28(4):452–6.
52. Bowers C.Y. History to the Discovery of Ghrelin. *Methods Enzymol.* 2012 Jan 1;514:3–32. doi: 10.1016/B978-0-12-381272-8.00001-5
53. Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999 Dec 9;402(6762):656–60. doi: 10.1038/45230
54. Woliński J., Goncharova K., Wychowański P., Słupecka-Ziemilska M. Oddziaływanie na rozwój przewodu pokarmowego młodych ssaków. Wybrane aspekty Monografia. 2016.
55. Cheung C.K., Wu J.C.Y. Role of ghrelin in the pathophysiology of gastrointestinal disease. *Gut Liver.* 2013;7(5):505–12. doi: 10.5009/gnl.2013.7.5.505
56. Mani B.K., Zigman J.M. Ghrelin as a Survival Hormone. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2017;28(12):843–54. doi: 10.1016/j.tem.2017.10.001
57. Castañeda T.R., Tong J., Datta R., Culler M., Tschöp M.H. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol.* 2010 Jan;31(1):44–60. doi: 10.1016/j.yfrne.2009.10.008
58. Nikolopoulos D., Theocharis S., Kouraklis G. Ghrelin, another factor affecting bone metabolism. *Med Sci Monit.* 2010;16(7):RA147-62.

59. Bellone S., Castellino N., Broglio F., Rapa A., Vivenza D., Radetti G., Bellone J., Goterro C., Ghigo E., Bona G. Ghrelin Secretion in Childhood Is Refractory to the Inhibitory Effect of Feeding. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Apr 1;89(4):1662–5. doi: 10.1210/jc.2003-031207
60. Arvat E., Di Vito L., Broglio F., Papotti M., Muccioli G., Dieguez C., Casanueva F.F., Deghenghi R., Cammani F., Ghigo E. Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *J Endocrinol Invest.* 2000 Sep 11;23(8):493–5. doi: 10.1007/BF03343763
61. Yin Y., Li Y., Zhang W., Yin Y., Li Y., Zhang W. The Growth Hormone Secretagogue Receptor: Its Intracellular Signaling and Regulation. *Int J Mol Sci.* 2014 Mar 19;15(3):4837–55. doi: 10.3390/ijms15034837
62. Avau B., Carbone F., Tack J., Depoortere I. Ghrelin signaling in the gut, its physiological properties, and therapeutic potential. *Neurogastroenterol Motil.* 2013;25(9):720–32. doi: 10.1111/nmo.12193
63. Masuda Y., Tanaka T., Inomata N., Ohnuma N., Tanaka S., Itoh Z., Hosoda H., Kojima M, Kangawa K. Ghrelin Stimulates Gastric Acid Secretion and Motility in Rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Oct 5;276(3):905–8. doi: 10.1006/bbrc.2000.3568
64. Brzozowski T., Konturek P.C., Pajdo R., Kwiecień S., Ptak A., Śliwowski Z., Drozdowicz D., Pawlik M., Konturek S.J., Hahn E.G. Brain-gut axis in gastroprotection by leptin and cholecystokinin against ischemia-reperfusion induced gastric lesions *J. Physiol Pharmacol.* 2001 Dec;52(4 Pt 1):583-602.
65. Sibilia V., Rindi G., Pagani F., Rapetti D., Locatelli V., Torsello A., Campanini N., Deghenghi R., Netti C. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action. *Endocrinology.* 2003 Jan;144(1):353–9. doi: 10.1210/en.2002-220756
66. Brzozowski T., Konturek P.C., Konturek S.J., Kwiecień S., Drozdowicz D., Bielański W., Pajdo R., Ptak A., Nikiforuk A., Pawlik W.W., Hahn E.G. Exogenous and endogenous ghrelin in gastroprotection against stress-induced gastric damage. *Regul Pept.* 2004 Aug 15;120(1–3):39–51. doi: 10.1016/j.regpep.2004.02.010

67. Holzer P. Local microcirculatory reflexes and afferent signalling in response to gastric acid challenge. *Gut*. 2000 Dec;47 Suppl 4(Suppl 4):iv46-8; discussion iv52. doi: 10.1136/gut.47.suppl\_4.iv46
68. Mosińska P., Zatorski H., Storr M., Fichna J. Future treatment of constipation-associated disorders: Role of relamorelin and other ghrelin receptor agonists. *J Neurogastroenterol Motil*. 2017 Apr 30;23(2):171–9. doi: 10.5056/jnm16183
69. Ohno T., Mochiki E., Kuwano H. The Roles of Motilin and Ghrelin in Gastrointestinal Motility. *Int J Pept*. 2010;2010:820794. doi: 10.1155/2010/820794
70. Peeters T.L. Ghrelin: A new player in the control of gastrointestinal functions. *Gut*. 2005 Nov;54(11):1638–49. doi: 10.1136/gut.2004.062604
71. Fujino K., Inui A., Asakawa A., Kihara N., Fujimura M., Fujimiya M. Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. *Journal of Physiology*. 2003;550(1):227–40. doi: 10.1113/jphysiol.2003.040600
72. Eğritaş Gürkan Ö, Dalgıç B, Bideci A. Relation between ghrelin level and treatment response in functional constipation. *Turkish Journal of Gastroenterology*. 2013;24(6):515–20.
73. Seim I., Collet C., Herington A.C., Chopin L.K. Revised genomic structure of the human ghrelin gene and identification of novel exons, alternative splice variants and natural antisense transcripts. *BMC Genomics*. 2007 Aug 30;8. doi: 10.1186/1471-2164-8-298
74. Xing Y.X., Yang L., Kuang H.Y., Gao X.Y., Liu H.L. Function of obestatin in the digestive system. *Nutrition*. 2017;34(2017):21–8. doi: 10.1016/j.nut.2016.08.009
75. Zhang J.V., Ren P., Avsian-Kretchmer O., Ching-Wei L., Rauch R., Klein C., Hsueh A.J.W. Obestatin, a Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin's Effects on Food Intake. 2005;310(November):996–1000. doi: 10.1126/science.1117255
76. Dong X.Y., He J.M., Tang S.Q., Li H.Y., Jiang Q.Y., Zou X.T. Is GPR39 the natural receptor of obestatin? *Peptides (NY)*. 2009;30(2):431–8. doi: 10.1016/j.peptides.2008.09.022

77. Tremblay F., Perreault M., Klaman L.D., Tobin J.F., Smith E., Gimeno R.E. Normal food intake and body weight in mice lacking the G protein-coupled receptor GPR39. *Endocrinology*. 2007;148(2):501–6. doi: 10.1210/en.2006-1275
78. Moechars D., Depoortere I., Moreaux B., de Smet B., Goris I., Hoskens L., Dnnels G., Kass S., Ven Donck L., Peeters T., Coulie B. Altered Gastrointestinal and Metabolic Function in the GPR39-Obestatin Receptor-Knockout Mouse. *Gastroenterology*. 2006;131(4):1131–41. doi: 10.1053/j.gastro.2006.07.009
79. Dittmer S., Sahin M., Pantlen A., Saxena A., Toutzaris D., Pina A.L., Geerts A., Golz S., Methner A. The constitutively active orphan G-protein-coupled receptor GPR39 protects from cell death by increasing secretion of pigment epithelium-derived growth factor. *J Biol Chem*. 2008 Mar 14;283(11):7074–81. doi: 10.1074/jbc.M704323200
80. Holst B., Egerod K.L., Schild E., Vickers S.P., Cheetham S., Gerlach L.O., Storjohann L., Stidsen C.E., Jones R., Beck-Sickinger A.G., Schwartz T.W. GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology*. 2007;148(1):13–20. doi: 10.1210/en.2006-0933
81. Zhang J V., Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh A.J.W. Medicine: Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science (1979)*. 2005;310(5750):996–9. doi: 10.1126/science.1117255
82. Egerod K.L., Holst B., Petersen P.S., Hansen J.B., Mulder J., Hökfelt T., Schwartz T.W. GPR39 splice variants versus antisense gene LYPD1: expression and regulation in gastrointestinal tract, endocrine pancreas, liver, and white adipose tissue. *Mol Endocrinol*. 2007 Jul;21(7):1685–98. doi: 10.1210/me.2007-0055
83. Depoortere I. GI functions of GPR39: Novel biology. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12(6):647–52. doi: 10.1016/j.coph.2012.07.019
84. Kołodziejcki P.A., Pruszyńska-Oszmalek E., Sassek M., Kaczmarek P., Szczepankiewicz D., Billert M., Maćkowiak P., Strowski M.Z. Nowak K.W. Changes in obestatin gene and GPR39 receptor expression in peripheral tissues of rat models of obesity, type 1 and type 2 diabetes. 2017 Apr;9(4):353-361. doi: 10.1111/1753-0407.12417

85. Ataka K., Inui A., Asakawa A., Kato I., Fujimiya M. Obestatin inhibits motor activity in the antrum and duodenum in the fed state of conscious rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008 May; 294(5). doi: 10.1152/ajpgi.00549.2007
86. Egado E.M., Hernández R., Marco J., Silvestre R.A. Effect of obestatin on insulin, glucagon and somatostatin secretion in the perfused rat pancreas. *Regul Pept.* 2009 Jan 8;152(1–3):61–6. doi: 10.1016/j.regpep.2008.08.003
87. Aydin S., Ozkan Y., Erman F., Gurates B., Kilic N., Colak R., Gundogan T., Catak Z., Bozkurt M., Akin O., Sen Y., Sahn I. Presence of obestatin in breast milk: relationship among obestatin, ghrelin, and leptin in lactating women. *Nutrition.* 2008 Jul; 24(7–8):689–93. doi: 10.1016/j.nut.2008.03.020
88. Seim I., Amorim L., Walpole C., Carter S., Chopin L.K., Herington A.C. Ghrelin gene-related peptides: multifunctional endocrine / autocrine modulators in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010; 37(1):125–31. doi: 10.1111/j.1440-1681.2009.05241.x
89. Woliński J., Szczurek P., Pierzynowska K., Wychowański P., Seklecka B., Boryczka M., Kuwahara A., Kato I., Drachanchuk O., Zaworski K., Pierzynowski S.G., Słupecka-Ziemilska M. Influence of obestatin on the histological development of the small intestine in piglets during the first week of postnatal life. *Animal.* 2020 Jan 1; 14(10):2129–37. doi: 10.1017/S1751731120000919
90. Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.* 1999 Mar;51(1):7–61.
91. Tapiero H., Mathé G., Couvreur P., Tew K.D. II. Glutamine and glutamate. *Biomed Pharmacother.* 2002; 56(9):446–57. doi: 10.1016/s0753-3322(02)00285-8
92. Young R.L., Cooper N.J., Ashley Blackshaw L. Anatomy and function of group III metabotropic glutamate receptors in gastric vagal pathways. *Neuropharmacology.* 2008 May;54(6):965–75. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.02.010
93. Kirchgessner A.L. Glutamate in the enteric nervous system. *Curr Opin Pharmacol.* 2001;1(6):591–6. doi: 10.1016/s1471-4892(01)00101-1

94. Tong Q., Kirchgessner A.L. Localization and function of metabotropic glutamate receptor 8 in the enteric nervous system. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2003 Nov;285(5):G992–1003. doi: 10.1152/ajpgi.00118.2003
95. Cartmell J., Schoepp D.D. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. *J Neurochem*. 2000;75(3). doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0750889.x
96. Julio-Pieper M., O'Connor R.M., Dinan T.G., Cryan J.F. Regulation of the brain-gut axis by group III metabotropic glutamate receptors. *Eur J Pharmacol*. 2013 Jan 5;698(1–3):19–30. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.10.027
97. Palazzo E., Marabese I., de Novellis V., Rossi F., Maione S.. Metabotropic Glutamate Receptor 7: From Synaptic Function to Therapeutic Implications. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(5):504–13. doi: 10.2174/1570159x13666150716165323
98. Corti C., Restituito S., Rimland J.M., Brabet I., Corsi M., Pin J.P., Ferraguti F. Cloning and characterization of alternative mRNA forms for the rat metabotropic glutamate receptors mGluR7 and mGluR8. *Eur J Neurosci*. 1998 Dec;10(12):3629–41. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00371.x
99. Kinzie J.M., Saugstad J.A., Westbrook G.L., Segerson T.P. Distribution of metabotropic glutamate receptor 7 messenger RNA in the developing and adult rat brain. *Neuroscience*. 1995 Nov;69(1):167–76. doi: 10.1016/0306-4522(95)00244-d
100. Bradley S.R., Levey A.I., Hersch S.M., Conn P.J. Immunocytochemical localization of group III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus with subtype-specific antibodies. *J Neurosci*. 1996 Mar 15;16(6):2044–56. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-06-02044.1996
101. Shigemoto R., Kinoshita A., Wada E., Nomura S., Ohishi H., Takada M., Flor P.J., Neki A. Abe T. Nakanishi S., Mizuno N. Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J Neurosci*. 1997 Oct 1;17(19):7503-22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-19-07503.1997

102. Wada E., Shigemoto R., Kinoshita A., Ohishi H., Mizuno N. Metabotropic glutamate receptor subtypes in axon terminals of projection fibers from the main and accessory olfactory bulbs: A light and electron microscopic immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol.* 1998;393(4):493–504.
103. Olivero G., Vergassola M., Cisani F., Roggeri A., Pittaluga A. Presynaptic Release-regulating Metabotropic Glutamate Receptors: An Update. *Curr Neuropharmacol.* 2020 Nov 28; 18(7):655. doi: 10.2174/1570159X17666191127112339
104. Ribeiro F.M., Vieira L.B., Pires R.G.W., Olmo R.P., Ferguson S.S.G. Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res.* 2017;115:179–91. doi: 10.1016/j.phrs.2016.11.013
105. O'Connor R.M., Cryan J.F. Role of metabotropic glutamate receptors in CNS disorders. *G Protein-Coupled Receptors: Structure, Signaling, and Physiology.* 2010. 321–379 p. Cambridge University Press, Cambridge, UK
106. Conn JP. Physiological roles and therapeutic potential of metabotropic glutamate receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 1003:12–21. doi: 10.1196/annals.1300.002
107. Cryan J.F., Kelly P.H., Neijt H.C., Sansig G., Flor P.J., Van Der Putten H. Antidepressant and anxiolytic-like effects in mice lacking the group III metabotropic glutamate receptor mGluR7. *Eur J Neurosci.* 2003 Jun;17(11):2409-17. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02667.x
108. Julio-Pieper M., O'Connor R.M., Dinan T.G., Cryan J.F. Regulation of the brain-gut axis by group III metabotropic glutamate receptors. *Eur J Pharmacol.* 2013;698(1–3):19–30. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.10.027
109. Uneyama H., Nijima A., San Gabriel A., Torii K. Luminal amino acid sensing in the rat gastric mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006 Dec; 291(6):1163–70. doi: 10.1152/ajpgi.00587.2005
110. Mitsukawa K., Mombereau C., Lötscher E., Uzunov D.P., Van Der Putten H., Flor P.J., Cryan J.F. Metabotropic glutamate receptor subtype 7 ablation causes dysregulation of the HPA axis and increases hippocampal BDNF protein levels: Implications for stress-related psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology.* 2006;31(6):1112–22. doi: 10.1038/sj.npp.1300926

111. Crupi R., Impellizzeri D., Cuzzocrea S. Role of Metabotropic Glutamate Receptors in Neurological Disorders. *Front Mol Neurosci.* 2019; 12:20. doi: 10.3389/fnmol.2019.00020
112. Janković S.M., Milovanović D., Matović M., Irić-Cupić V. The effects of excitatory amino acids on isolated gut segments of the rat. *Pharmacol Res.* 1999 Feb; 39(2):143–8. doi: 10.1006/phrs.1998.0422
113. Giaroni C., Zanetti E., Marino F., Cosentino M., Senaldi A., Somaini L., Ferrari M., Bombelli R., Lecchini S., Frigo G. Glutamate receptors of the AMPA type modulate neurotransmitter release and peristalsis in the guinea-pig isolated colon. *Life Sci.* 2000;67(14):1747–57. doi: 10.1016/s0024-3205(00)00760-8
114. Baj A., Moro E., Bistoletti M., Orlandi V., Crema F., Giaroni C. Glutamatergic Signaling Along The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 25;20(6):1482. doi: 10.3390/ijms20061482
115. Julio-Pieper M., Hyland N., Bravo J., Dinan T., Cryan J.F. A novel role for the metabotropic glutamate receptor-7: Modulation of faecal water content and colonic electrolyte transport in the mouse. *Br J Pharmacol.* 2010;160(2):367–75. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00713.x
116. Kim E.R., Rhee P.L. How to interpret a functional or motility test - colon transit study. *J Neurogastroenterol Motil.* 2012 Jan;18(1):94–9. doi: 10.5056/jnm.2012.18.1.94
117. Soares N.C., Ford A.C. Prevalence of, and risk factors for, chronic idiopathic constipation in the community: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2011 Sep;106(9):1582–91. doi: 10.1038/ajg.2011.164
118. Karasawa H., Pietra C., Giuliano C., Garcia-Rubio S., Xu X., Yakabi S., Tache Y., Wang L. New ghrelin agonist, HM01 alleviates constipation and L-dopa-delayed gastric emptying in 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Neurogastroenterol Motil.* 2014;26(12):1771–82. doi: 10.1111/nmo.12459
119. Sjölund K., Fasth S., Ekman R., Hultén L., Jiborn H., Nordgren S., Sundler F. Neuropeptides in idiopathic chronic constipation (slow transit constipation). *Neurogastroenterol Motil.* 1997 Sep;9(3):143–50. doi: 10.1046/j.1365-2982.1997.d01-46.x



120. Pustovit R.V., Callaghan B., Kosari S., Rivera L.R., Thomas H., Brock J.A., Furness J.B. The mechanism of enhanced defecation caused by the ghrelin receptor agonist, ulimorelin. *Neurogastroenterol Motil.* 2014;26(2):264–71. doi: 10.1111/nmo.12259
121. Sahin-Eryilmaz G., Basak K., Cakir-Madenci O., Koc H., Tuzun S., Dolapcioglu C., Ashishali E., Dabak M.R. Relationship between irritable bowel syndrome and plasma and tissue ghrelin levels. *The Turkish Journal of Gastroenterology.* 2018 Oct 22;631–5. doi: 10.5152/tjg.2018.17593
122. Trudel L., Tomasetto C., Rio M.C., Bouin M., Plourde V., Eberling P., Poitras P. Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 Jun 1; 282(6):G948–52. doi: 10.1152/ajpgi.00339.2001
123. Huang H.H., Ting C.H., Syu Y.F., Chang S.C., Chen C.Y. Correlation between colonic secretion and colonic motility in rats: Role of ghrelin. *World J Gastroenterol.* 2016 Dec 12; 22(46):10140. doi: 10.3748/wjg.v22.i46.10140
124. Pustovit R.V., Furness J.B., Rivera L.R. A ghrelin receptor agonist is an effective colokinetic in rats with diet-induced constipation. *Neurogastroenterol Motil.* 2015;27(5):610–7. doi: 10.1111/nmo.12517
125. Pustovit R.V., Callaghan B., Ringuet M.T., Kerr N.F., Hunne B., Smyth I.M., Pietra C., Furness J.B. Evidence that central pathways that mediate defecation utilize ghrelin receptors but do not require endogenous ghrelin. *Physiol Rep.* 2017;5(15):1–11. doi: 10.14814/phy2.13385
126. Ferens D.M., Habgood M.D., Saunders N.R., Tan Y.H., Brown D.J., Brock J.A., Furness J.B. Stimulation of defecation in spinal cord-injured rats by a centrally acting ghrelin receptor agonist. *Spinal Cord.* 2011 Oct;49(10):1036–41. doi: 10.1038/sc.2011.60
127. Acosta A., Camilleri M., Kolar G., Iturrino J., Szarka L.A., Boldingh A., et al. Relamorelin Relieves Constipation and Accelerates Colonic Transit in a Phase 2, Placebo-Controlled, Randomized Trial. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015 Dec 1;13(13):2312-2319.e1. doi: 10.1016/j.cgh.2015.04.184

128. Sha L., van der Ploeg L.H., Szurszewski J.H. Effect of RM-131 on Circular Smooth Muscle Cells in Human and Mouse Colon and on Colonic Intraluminal Pressure in Conscious Mice. *Gastroenterol.* 2014 May;146(5):S-363.
129. James J., Mair S., Doll W., Sandefer E., Wurtman D., Maurer A., Deane A.M., Harris M.S. The effects of ulimorelin, a ghrelin agonist, on liquid gastric emptying and colonic transit in humans. *Neurogastroenterol Motil.* 2020 Mar 1; 32(3). doi: 10.1111/nmo.13784
130. Yu A.P., Ugwu F.N., Tam B.T., Lee P.H., Lai C.W., Wong C.S.C., Siu P.M.. Ghrelin Axis Reveals the Interacting Influence of Central Obesity and Hypertension. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018 Sep 12; 9(SEP):534. doi: 10.3389/fendo.2018.00534
131. Alexandridis E., Zisimopoulos A., Liratzopoulos N., Katsos I., Manolas K., Kouklakis G. Obestatin/ghrelin ratio: A new activity index in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2009 Oct 1;15(10):1557–61. doi: 10.1002/ibd.20940
132. Sedláčková D., Kopečková J., Papežová H., Vybíral S., Kvasničková H., Hill M., Nedvídková J. Changes of plasma obestatin, ghrelin and NPY in anorexia and bulimia nervosa patients before and after a high-carbohydrate breakfast. *Physiol Res.* 2011;60(1):165–73. doi: 10.33549/physiolres.931952
133. Bülbül M., Babygirija R., Zheng J., Ludwig K., Xu H., Lazar J., Takahashi T. Food intake and interdigestive gastrointestinal motility in ghrelin receptor mutant rats. *J Gastroenterol.* 2011 Apr 22; 46(4):469–78. doi: 10.1007/s00535-010-0366-6
134. Wang Y., Chen F., Shi H., Jiang J., Li H., Qin B., Yong L.. Extrinsic ghrelin in the paraventricular nucleus increases small intestinal motility in rats by activating central growth hormone secretagogue and enteric cholinergic receptors. *Peptides (NY).* 2015 Dec 1; 74:43–9. doi: 10.1016/j.peptides.2015.09.009
135. Camilleri M. Novel therapeutic agents in neurogastroenterology: Advances in the past year. *Neurogastroenterol Motil.* 2014;26(8):1070–8. doi: 10.1111/nmo.12386

136. Zhao C.M., Furnes M.W., Stenström B., Kulseng B., Chen D. Characterization of obestatin- and ghrelin-producing cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rats: an immunohistochemical and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res.* 2008 Mar; 331(3):575–87. doi: 10.1007/s00441-007-0514-3
137. Chen C.Y., Chien E.J., Chang F.Y., Lu C.L., Luo J.C., Lee SD. Impacts of peripheral obestatin on colonic motility and secretion in conscious fed rats. *Peptides (NY)*. 2008;29(9):1603–8. oi: 10.1016/j.peptides.2008.05.003
138. Słupecka M., Grzesiak P., Kwiatkowski J., Gajewska M., Kuwahara A., Kato I., Woliński J. The influence of enteral obestatin administration to suckling rats on intestinal contractility. *Gen Comp Endocrinol.* 2017;248(2017):69–78. doi: 10.1016/j.ygcen.2017.02.006
139. Xing Y.X.X., Yang L., Kuang H.Y.Y., Gao X.Y.Y., Liu H.L.L. Function of obestatin in the digestive system. *Nutrition.* 2017 Feb 1;34(2017):21–8. doi: 10.1016/j.nut.2016.08.009
140. Müller T.D., Nogueiras R., Andermann M.L., Andrews Z.B., Anker S.D., Argente J., et al. Ghrelin. *Mol Metab.* 2015 Mar 21;4(6):437-60. doi: 10.1016/j.molmet.2015.03.005
141. Fernández-Montoya J., Avendaño C., Negrodo P. The Glutamatergic System in Primary Somatosensory Neurons and Its Involvement in Sensory Input-Dependent Plasticity. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 1;19(1). doi: 10.3390/ijms19010069
142. Baj A., Moro E., Bistoletti M., Orlandi V., Crema F., Giaroni C. Glutamatergic Signaling Along The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar 2; 20(6). doi: 10.3390/ijms20061482
143. Shao L., Liu Y., Xiao J., Wang Q., Liu F., Ding J. Activating metabotropic glutamate receptor-7 attenuates visceral hypersensitivity in neonatal maternally separated rats. *Int J Mol Med.* 2019 Feb 1; 43(2):761–70. doi: 10.3892/ijmm.2018.4022

INSTYTUT  
"CENTRUM ZDROWIA MATKI POLKI"  
KLINIKA CHIRURGII I UROLOGII DZIECIĘCEJ  
93-338 Łódź, ul. Rzgowska 281/289  
tel/fax 0-48-42 271-13-58, 271-21-36  
471610127-003, 051/110006/03/010/09

Łódź, 23 września 2009 r.

**KOMISJA  
ETYKI BADAŃ NAUKOWYCH**  
Instytutu  
"Centrum Zdrowia Matki Polki"

Doc. dr hab. n. med. Elżbieta Czkwianianc  
Klinika Gastroenterologii  
Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki

Komisja Etyki Badań Naukowych Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki na posiedzeniu  
w dniu 23 września 2009 r. rozpatrywała wniosek dotyczący pracy:

**„Wpływ enterohormonów (grelina i obestatyna) na rozwinięcie przewlekłej choroby  
zaparciowej u dzieci z czynnościowym zaparciem stolca.”**

Opinia

Komisja Etyki Badań Naukowych przy Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki zapoznała się  
z ww projektem eksperymentu medycznego, przeanalizowała wniosek, wysłuchała opinii recenzenta o  
przedstawionym projekcie i wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz tajnego głosowania, po  
rozważeniu kryteriów etycznych oraz celowości i wykonalności projektu pozytywnie zaopiniowała  
projekt eksperymentu medycznego.

Przewodniczący:

Prof. dr hab. med. Andrzej Chilarski

Członkowie:

Prof. dr hab. med. Tadeusz Biegański

Ks. Mateusz Cieplucha

Dr n. med. Paweł Czekalski

Mgr Grażyna Korybut

Prof. dr hab. med. Izabela Planeta-Małecka

Prof. dr hab. med. Krzysztof Szaflik

Dr hab. filozofii Wojciech Sztombka

Prof. dr n. med. Krzysztof Szyłło

Prof. dr hab. med. Jan Wilczyński

Prof. dr hab. med. Teresa Woźniakowska-Gęsicka

Handwritten signatures of the commission members on a form with dotted lines. The signatures are: Andrzej Chilarski, Tadeusz Biegański, Mateusz Cieplucha, Paweł Czekalski, Grażyna Korybut, Izabela Planeta-Małecka, Krzysztof Szaflik, Wojciech Sztombka, Krzysztof Szyłło, Jan Wilczyński, and Teresa Woźniakowska-Gęsicka. A large arrow points from the top signature to the bottom signature.

Łódź, dnia 06 czerwca 2017 r. r.

Lek. med. Michał Kolejwa  
Klinika Gastroenterologii, Alergologii i Pediatrii  
Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki

Komisja Bioetyczna przy Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki działając zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Klinicznej na posiedzeniu w dniu 06 czerwca 2017 r. rozpatrywała wniosek dotyczący pracy:

**„Udział ghreliny, obestatyny i kwasu glutaminowego oraz właściwych im receptorów w patogenezie czynnościowego zaparcia stolca u dzieci”**

**Opinia Nr 48/2017**

Komisja Bioetyczna przy Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki zapoznała się z ww projektem eksperymentu medycznego, przeanalizowała wniosek, wysłuchała opinii recenzenta o przedstawionym projekcie i wyniku przeprowadzonej dyskusji oraz tajnego głosowania, po rozważeniu kryteriów etycznych oraz celowości i wykonalności projektu pozytywnie zaopiniowała projekt eksperymentu medycznego.

Uchwałę podjęto jednogłośnie.

Uchwałę podjęto przy sprzeciwie .....

Przewodnicząca:

Dr hab. med. Iwona Maroszyńska, prof. ICZMP.....

Zastępca Przewodniczącej:

Prof. dr hab. n. farm. Daria Orszulak-Michalak .....

Członkowie:

Mec. Michał Araszkiewicz .....

Prof. dr hab. n. med. Tadeusz Biegański .....

Dr n. med. Paweł Czekalski .....

Mgr Grażyna Korybut .....

Prof. dr hab. med. Jerzy Niedzielski .....

Prof. dr hab. med. Jacek Rysz .....

Prof. dr hab. med. Krzysztof Szaflik .....

Dr n. filozofii Wojciech Sztombka .....

Prof. dr n. med. Krzysztof Szyłło .....

Ks. dr hab. Jan Wolski .....

Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Zeman .....