

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Nauk o Zdrowiu

lek. med. Jakub Bukowczan

**Ochronne i lecznicze działanie obestatyny  
w eksperymentalnych modelach  
ostrego zapalenia trzustki**

*Praca doktorska  
cykl prac monotematycznych*

Promotor: dr hab. n. med. Piotr Ceranowicz

Promotor pomocniczy: dr n. med. Joanna Bonior

Miejsce wykonywania pracy:

Zakład Fizjologii Klinicznej Katedry Fizjologii, Wydział Lekarski  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Artur Dembiński

Department of Endocrinology and Diabetes Mellitus, Northumbria NHS Foundation  
Trust, Rake Lane, North Shields, Tyne and Wear, United Kingdom  
Kierownik: Stuart Bennett, MD

Kraków, 2016

*Składam serdeczne podziękowania*

*Panu Dr. hab. n. med. Piotrowi Ceranowiczowi  
Promotorowi mojej pracy*

*oraz*

*Pani Dr n. med. Joannie Bonior  
Promotorowi Pomocniczemu*

*za ogromną życzliwość, wsparcie i wyrozumiałość  
oraz bardzo szeroką - nieocenioną i ustawiczną pomoc merytoryczną i badawczą, bez której  
wykonanie niniejszej pracy nie byłoby możliwe*

*Panu Prof. dr. hab. n. med. Arturowi Dembińskiemu  
za życzliwość oraz umożliwienie przeprowadzenia badań*

*Pani Prof. dr hab. n. med. Romanie Tomaszewskiej  
za ocenę histologiczną preparatów*

## Spis treści

Spis skrótów .....	2
Streszczenie .....	3
Summary .....	5
I. Wstęp i teoretyczne podstawy pracy .....	7
II. Spis publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej.....	9
III. Cel pracy.....	10
IV. Metody i organizacja badań.....	11
V. Wyniki badań .....	13
1. Pierwszy etap badań: Wpływ wcześniejszego podawania obestatyny na rozwój martwiczo-krwotocznego ostrego zapalenia trzustki.....	13
1.1. Zmiany patomorfologiczne.....	13
1.2. Trzustkowy przepływ krwi.....	14
1.3. Trzustkowa synteza kwasu deoksyrybonukleinowego .....	14
1.4. Poziom aktywności lipazy i stężenia prozapalnej interleukiny-1 $\beta$ w surowicy krwi.....	15
1.5. Poziom stresu oksydacyjnego w trzustce wyrażony stężeniem dialdehydu malonowego i aktywnością dysmutazy ponadtlenuj.....	17
1.6. Aktywność mieloperoksydazy w trzustce .....	19
2. Drugi etap badań: Lecniczy wpływ obestatyny na przebieg martwiczo-krwotocznego ostrego zapalenia trzustki .....	20
2.1. Trzustkowy przepływ krwi.....	20
2.2. Parametry biochemiczne.....	21
2.3. Trzustkowa synteza kwasu deoksyrybonukleinowego .....	24
2.4. Zmiany patomorfologiczne.....	25
3. Trzeci etap badań: Wpływ podawania obestatyny na leczenie obrzękowego ostrego zapalenia trzustki o łagodnym przebiegu.....	27
3.1. Trzustkowy przepływ krwi.....	27
3.2. Masa trzustki .....	28
3.3. Parametry biochemiczne.....	28
3.4. Trzustkowa synteza kwasu deoksyrybonukleinowego .....	31
3.5. Ocena patomorfologiczna .....	32
VI. Podsumowanie i wniosek.....	34
VII. Piśmiennictwo .....	35
VIII. Spis tabel i rycin.....	37
Spis tabel .....	37
Spis rycin.....	37
IX. Publikacje składające się na pracę doktorską .....	40

## Spis skrótów

AP	<i>(ang. <u>A</u>cute <u>P</u>ancreatitis)</i>	- ostre zapalenie trzustki
CZT		- ceruleinowe zapalenie trzustki
DNA	<i>(ang. <u>D</u>eoxyribonucleic <u>A</u>cid)</i>	- kwas deoksyrybonukleinowy
GHRL	<i>(ang. <u>G</u>hrel<u>i</u>n)</i>	- grelina
GLP1R	<i>(ang. <u>G</u>lucagon-<u>L</u>ike <u>P</u>eptide <u>1</u> <u>R</u>eceptor)</i>	- receptor glukagonopodobnego peptydu 1
GPR39	<i>(ang. <u>G</u>-<u>P</u>rotein Coupled <u>R</u>eceptor 39)</i>	- związany z białkiem G sierocy receptor 39
I	<i>(ang. <u>I</u>schemia)</i>	- miejscowe niedokrwienie
IL	<i>(ang. <u>I</u>nterleukin)</i>	- interleukina
i. p.	<i>(ang. <u>I</u>ntraperitoneal)</i>	- do otrzewnej
MDA	<i>(ang. <u>M</u>alondialdehyde)</i>	- dialdehyd malonowy
MPO	<i>(ang. <u>M</u>yeloperoxidase)</i>	- mieloperoksydaza
SOD	<i>(ang. <u>S</u>uper<u>O</u>xide <u>D</u>ismutase)</i>	- dysmutaza ponadtlenkowa
OZT		- ostre zapalenie trzustki
R	<i>(ang. <u>R</u>eperfusion)</i>	- reperfuzja
TPK		- trzustkowy przepływ krwi

## Streszczenie

### Wstęp

Prowadzone w ostatnim okresie badania eksperymentalne dowodzą, że obestatyna wykazuje działanie ochronne i lecznicze w obrębie niektórych narządów, takich jak żołądek, nerki, czy mózg. W trzustce wykazano, że wcześniejsze podawanie obestatyny hamuje rozwój ostrego obrzękowego zapalenia trzustki wywołanego ceruleiną, zwiększa przeżywalność komórek beta trzustki oraz wysp trzustkowych. Dotychczas nie badano wpływu podawania obestatyny na rozwój i przebieg martwiczo-krwotocznego ostrego zapalenia trzustki (OZT) w modelach eksperymentalnych. Ponadto udowodniono ochronny wpływ obestatyny podawanej przed rozwojem ostrego ceruleinowego zapalenia trzustki (CZT), jednak dotychczas nie przeprowadzono badań nad wpływem podawania tego peptydu w przebiegu CZT.

### Cel pracy

Celem pracy była ocena wpływu podawania obestatyny na powstawanie OZT w modelu niedokrwienno-reperfuzyjnym (ang. *Ischemia-Reperfusion – I/R*), jak też i na jego przebieg (gojenie) w dwóch modelach eksperymentalnych. Badania zostały przeprowadzone w trzech etapach. Celem pierwszego etapu badań było sprawdzenie, czy ochronne działanie obestatyny na trzustkę ma charakter uniwersalny i czy występuje w modelu I/R OZT. Celem kolejnego etapu badań było zbadanie, czy podawanie obestatyny po wywołaniu OZT wpływa na jego przebieg. Ostatnim celem badań było sprawdzenie, jaki był wpływ podawania obestatyny na zdolności regeneracyjne komórek trzustki i rozwój lokalnego oraz ogólnego procesu zapalnego.

### Metody badawcze

W pierwszym etapie badań OZT było wywołane I z następującą R trzustki. Obestatyna (4, 8, 16 nmol/kg/dawkę) była podawana dootrzewnowo (ang. *Intraperitoneal – i. p.*) dwukrotnie: 0,5 h przed I, a następnie 3 godziny od pierwszego podania obestatyny. Wpływ obestatyny na przebieg OZT był oceniany po okresie 6-godzinnej R i uwzględniał ocenę histologiczną, czynnościową i biochemiczną. Druga część badań polegała na wywołaniu OZT w mechanizmie ostrego I z następującą R i podawaniu obestatyny (8 nmol/kg/dawkę i. p.) dwa razy na dzień, począwszy od 24-tej

godziny od wywołania zapalenia trzustki. Wpływ obestatyny na przebieg martwiczo-krwotocznego OZT był oceniany w okresie między 2 a 14 dniem i obejmował również ocenę histologiczną, czynnościową i biochemiczną zmian w trzustce. W trzecim etapie badań OZT było wywołane 5-krotnym podaniem ceruleiny w odstępach 1-godzinnych w dawce 50 µg/kg/dawkę i. p. Obestatynę podawano dwa razy na dzień w dawce 8 nmol/kg/dawkę i. p., pierwszą dawkę podając 24 godziny od ostatniego podania ceruleiny.

### **Wyniki i wnioski**

Obwodowe podawanie obestatyny hamowało rozwój OZT w modelu martwiczo-krwotocznym. Wyniki te wskazują na uniwersalny charakter ochronnego wpływu tego peptydu na trzustkę bez względu na pierwotną przyczynę OZT. Ponadto leczenie egzogenną obestatyną łagodziło przebieg martwiczo-krwotocznego OZT oraz przyspieszało gojenie trzustki. Mechanizmy odpowiadające za powyższe obserwacje mają najprawdopodobniej charakter wieloczynnikowy i wynikają w pewnej mierze z przeciwzapalnych właściwości obestatyny. Dodatkowo zaobserwowano, że podawanie jej szczurom z obrzękowym, wywołanym podawaniem ceruleiny OZT, hamowała jego przebieg i przyspieszała gojenie zmian zapalnych w trzustce.

**Słowa kluczowe:** obestatyna, niedokrwienie, reperfuzja, ceruleina, ostre zapalenie trzustki

## **Summary**

### **Introduction**

Several previous studies have shown that obestatin exhibits protective and healing-promoting effects in some organs including the stomach, the kidneys, and the brain. In the pancreas, pretreatment with obestatin inhibits the development of cerulein-induced acute pancreatitis (CIP), and promotes survival of pancreatic beta cells and human islets. However, no studies investigated the effect of obestatin administration in the course of experimental acute ischemia/reperfusion (I/R) -induced pancreatitis in experimental models. Moreover, protective effect of pretreatment with obestatin in the cerulein-induced AP has been proved, however, no studies have investigated the consequences of this peptide administration on the course of cerulein-induced AP.

### **Aim of the study**

The aim of the first series of the study was to check the universality of protective effect of obestatin in the pancreas. For this reason we investigated the influence of obestatin administration on the development of ischemia/reperfusion-induced pancreatitis. The aim of the second series of the study was to evaluate the impact of obestatin therapy in the course of ischemia/reperfusion-induced pancreatitis. The aim of the third series of studies was to determine the impact of obestatin therapy on the course of cerulein-induced pancreatitis.

### **Methods**

In the first series of the study AP was induced by pancreatic ischemia followed by reperfusion of the gland. Obestatin (4, 8 or 16 nmol/kg/dose) was administered intraperitoneally twice: 0.5 h before exposure to ischemia, and 3 h after the first injection. The effect of obestatin on the course of necrotizing pancreatitis was assessed after 6-h reperfusion and included histological, functional, and biochemical analyses. In the second series of the study AP was induced by pancreatic ischemia followed by reperfusion of the pancreas. Obestatin (8 nmol/kg/dose) was administered intraperitoneally twice a day, starting 24 hours after the beginning of reperfusion. The effect of obestatin in the course of necrotizing pancreatitis was assessed between 2 and





14 days, and included histological, functional, and biochemical analyses. In the third series of the study AP was induced by cerulein given intraperitoneally 5 times with 1h intervals at the dose of 50 µg/kg/dose. Obestatin was administered twice a day at the dose of 8 nmol/kg/dose, starting with the first dose 24 h after the last injection of cerulein. Severity of acute pancreatitis was examined at 0 h or 1, 2, 3, 5, 7 and 10 days after the last injection of cerulein.

### **Results and conclusions**

Administration of obestatin inhibited the development of ischemia/reperfusion-induced AP. This observation indicated that the protective effect of obestatin in the pancreas is universal and independent of the primary cause of AP. Secondly, treatment with the exogenous obestatin reduced the severity of ischemia/reperfusion-induced AP and accelerated recovery of this disease. The involved mechanisms are likely multifactorial, and are mediated, at least in part, by anti-inflammatory properties of obestatin. Thirdly, treatment with exogenous obestatin reduced the severity of cerulein-induced AP and accelerated pancreatic recovery.

**Key words:** obestatin, ischemia, reperfusion, cerulein, acute pancreatitis

## I. Wstęp i teoretyczne podstawy pracy

OZT jest jedną z częstszych chorób przewodu pokarmowego i w zależności od rejonu świata, obserwuje się rocznie średnio od 13 do 45 przypadków zapalenia na 100 000 osób [Yadow & Lowenfels, 2013]. Pomimo znaczącego postępu w terapii OZT, jaki obserwuje się w ciągu ostatniej dekady, śmiertelność w OZT o ciężkim przebiegu nadal przekracza 30% [Working Group/APA, 2013]. Tak złe efekty terapeutyczne są wynikiem braku leczenia przyczynowego w OZT oraz ciągle niepełnym zrozumieniem mechanizmów regulacyjnych uczestniczących w patogenezie tego schorzenia. W trakcie przebiegu OZT dochodzi do kaskady zdarzeń obejmujących rozwój procesu zapalnego, apoptozę, martwicę i stres oksydacyjny, co może prowadzić do nieodwracalnych zmian morfologicznych i czynnościowych w trzustce oraz w innych narządach [Hammer, 2014].

Obestatyna jest 23 aminokwasowym peptydem obecnym w surowicy krwi i w organizmie, produkowana jest głównie w błonie śluzowej żołądka. Powstaje, tak jak i grelina (ang. *Ghrelin* – GHRL), w ramach wewnątrzkomórkowych przemian potranslacyjnych z preprogreliny. Została odkryta w roku 2005 przez Zhang'a i wsp. [Zhang i wsp., 2005]. Jej odkrywcy stwierdzili, że hamuje ona przyjmowanie pokarmu i dlatego też nazwali ją obestatyną. Jej nazwa została utworzona przez połączenie dwóch łacińskich słów: „*obedere*” znaczącego „pożerać” i „*stare*” znaczącego hamować. Zhang i wsp. sugerowali też, że obestatyna działa za pośrednictwem związanego z białkiem G sierocego receptora 39 (ang. *G-Protein Coupled Receptor 39* – GPR39), jednakże późniejsze prace wykazały, że peptyd nie działa poprzez GPR39, a jego receptor, jak dotychczas pozostaje nieznanym [Holst i wsp., 2007]. W późniejszym okresie Granata i wsp. sugerowali, że w efektach działania obestatyny, przynajmniej w trzustce, może uczestniczyć receptor glukagonopodobnego peptydu 1 (ang. *Glucagon-Like Peptide 1 Receptor* – GLP1R) [Granata i wsp., 2008], ale również ta koncepcja nie znalazła powszechnej akceptacji.

Także sugerowany przez odkrywców obestatyny jej efekt hamujący przyjmowanie pokarmu budzi kontrowersje. Liczne późniejsze badania nie potwierdziły tego efektu jej działania [Goucerol i wsp., 2006; Chen i wsp., 2009]. Aktualnie uważa się, że do pewnych rezultatów działania obestatyny należy zaliczyć hamowanie pragnienia [Samson i wsp., 2007], hamowanie uwalniania wazopresyny [Samson i wsp., 2008], zmniejszanie lęku

i poprawę pamięci [Carlini i wsp., 2007] oraz pogłębienie snu [Szentirmai & Krueger, 2006]. W obrębie przewodu pokarmowego wykazano pobudzający wpływ obestatyny na czynność zewnątrzwydzielniczą trzustki [Kapica i wsp., 2007]. Ponadto peptyd ten wpływa na opróżnianie żołądkowe i motorykę jelit, a także czynność parakrynną i endokrynną trzustki [Plusczyk i wsp., 2003; Trovato i wsp., 2014].

Prowadzone w ostatnim okresie badania eksperymentalne dowodzą, że obestatyna wykazuje działanie ochronne i lecznicze w uszkodzeniach przewodu pokarmowego. Podawanie obestatyny hamuje rozwój zapalenia jelita grubego [Pamukcu i wsp., 2013], jak też przyspiesza gojenie uszkodzeń błony śluzowej żołądka [Dembiński i wsp., 2011]. Ponadto odkryto, że zwiększa ona przeżywalność i zdolności proliferacyjne komórek beta trzustki oraz hamuje ich apoptozę, podobnie jak wysp trzustkowych w hodowli *in vitro* [Chen i wsp., 2009; Granata i wsp., 2008; Lacquqnti i wsp., 2011; i wsp., 2011]. Wykazano także, że wcześniejsze podawanie obestatyny hamuje rozwój ostrego obrzękowego zapalenia trzustki wywołanego ceruleiną [Ceranowicz i wsp., 2009].

Powyższe obserwacje sugerują, że obestatyna mogłaby być użyteczna w terapii OZT.

## II. Spis publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej

1. Bukowczan J, Warzecha Z, Ceranowicz P, Kuśnierz-Cabala B, Tomaszewska R, Dembiński A. Pretreatment with obestatin reduces the severity of ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis in rats. Eur J Pharmacol. 2015 Apr 23.

***Impact factor: 2,532***

2. Bukowczan J, Warzecha Z, Ceranowicz P, Kuśnierz-Cabala B, Tomaszewska R. Obestatin accelerates the recovery in the course of ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis in rats. PLOS ONE 07/2015; DOI: 10.1371/journal.pone.0134380.

***Impact factor: 3,234***

3. Bukowczan J, Cieszkowski J, Warzecha Z, Ceranowicz P, Kuśnierz-Cabala B, Tomaszewska R, Dembiński A. Therapeutic effect of obestatin in the course of cerulein-induced acute pancreatitis. Pancreas 2015. DOI: 10.1097/MPA.0000000000000517.

***Impact factor: 2,959***

***Łączny Impact Factor: 8,725***

### III. Cel pracy

Celem pracy była ocena wpływu podawania obestatyny na powstawanie OZT w modelu I/R, jak również na przebieg (gojenie) OZT w dwóch modelach eksperymentalnych – obrzękowym i martwiczo-krwotocznym.

Badania zostały przeprowadzone w trzech etapach, mających udzielić odpowiedzi na następujące pytania:

1. Czy ochronne działanie obestatyny na trzustkę ma charakter uniwersalny i czy występuje w modelu I/R OZT?
2. Czy podawanie obestatyny po wywołaniu OZT wpływa na przebieg tego zapalenia?
3. Czy efekt ten jest uniwersalny, czy też zależy od pierwotnej etiologii OZT?
4. Jaki jest wpływ podawania obestatyny na zdolności regeneracyjne komórek trzustki i rozwój lokalnego oraz ogólnego procesu zapalnego?

#### IV. Metody i organizacja badań

Badania zostały przeprowadzone w Zakładzie Fizjologii Klinicznej Katedry Fizjologii Wydziału Lekarskiego UJ CM w Krakowie na szczurach rasy Wistar płci męskiej, karmionych standardowym granulatem z zachowaniem swobodnego dostępu do wody oraz utrzymaniem prawidłowego libido. Zwierzęta przebywały w klatkach, umieszczonych w pomieszczeniu o temperaturze pokojowej, właściwie wietrzonym i oświetlonym, z utrzymaniem cyklu dzień/noc. Na 24 godziny przed eksperymentem zwierzęta pozbawiano pokarmu, zachowując nieograniczony dostęp do wody. Badania wykonywano zawsze o jednakowej porze dnia. Liczebność grup doświadczalnych była różna, zależna od rodzaju przeprowadzanego eksperymentu. Badania przeprowadzono zgodnie z protokołami zatwierdzonymi przez I Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (Uchwała nr 101/2007 z późniejszą zmianą z dn. 6 lipca 2011) i przebiegały one zgodnie z Zasadami Deklaracji Helsińskiej.

Eksperymenty zostały przeprowadzone w trzech etapach. Pierwszy etap dotyczył wpływu wcześniejszego podawania obestatyiny na rozwój martwiczo-krwotocznego OZT. Drugi etap dotyczył leczniczego wpływu obestatyiny na przebieg martwiczo-krwotocznego OZT. Etap trzeci dotyczył wpływu podawania obestatyiny na leczenie obrzękowego OZT o łagodnym przebiegu.

Ostre obrzękowe zapalenie trzustki o umiarkowanej ciężkości wywoływano przy użyciu ceruleiny podawanej pięciokrotnie, co godzinę w dawce 50 µg/kg/dawkę i. p., zgodnie z wcześniej opisaną metodyką [Ceranowicz i wsp., 2009]. Ostre krwotoczno-martwicze zapalenie trzustki zostało wywoływane poprzez 30 minutowe niedokrwienie trzustki z następową reperfuzją, zgodnie z uprzednio opisaną metodyką [Dembiński i wsp., 2006].

W pierwszym etapie badań został określony wpływ obestatyiny na rozwój ostrego martwiczo-krwotocznego zapalenia trzustki. Zwierzęta zostały podzielone na 8 następujących grup badawczych: (1) grupa kontrolna; (2-4) zwierzęta, którym podawano obestatyinę w dawce 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę i. p., bez wywoływania OZT; (5) zwierzęta, u których wywoływano martwiczo-krwotoczne OZT; (6-8) zwierzęta, którym wcześniej podawano obestatyinę w dawce 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę i. p., a następnie wywoływano martwiczo-krwotoczne OZT. Ciężkość zapalenia określano po 6-godzinnej reperfuzji trzustki. Badano następujące parametry: (1) ocena histologiczna

ciężkości zapalenia trzustki; (2) trzustkowy przepływ krwi (TPK); (3) trzustkowa synteza kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. *Deoxyribonucleic Acid* – DNA), będąca wyznacznikiem zdolności proliferacyjnej trzustki, a co za tym idzie żywotności komórek; (4) ocena osoczowego poziomu aktywności lipazy i stężenia prozapalnej interleukiny (ang. *Interleukin* – *IL*)-1 $\beta$ ; (5) określenie poziomu stresu oksydacyjnego w trzustce poprzez ocenę stężenia dialdehydu malonowego (ang. *Malondialdehyde* – MDA) i aktywności dysmutazy ponadtlenkowej(ang. *SuperOxide Dismutase* – SOD); (6) ocena trzustkowej aktywności mieloperoksydazy (ang. *Myeloperoxidase* – MPO).

W drugim etapie badań został określony wpływ podawania obestatyny na przebieg martwiczo-krwotocznego OZT, które zostało wywołane, identycznie jak w etapie pierwszym. Obestatyna była podawana dwa razy dziennie w dawce 8 nmol/kg/dawkę i. p., pierwsza dawka po 24 godzinach od początku reperfuzji. Obserwacja ciężkości OZT była prowadzona po upływie 2, 5, 9 i 14 dni od początku reperfuzji. Ocena była oparta o te same parametry, jak w pierwszym etapie badań.

W trzecim etapie badań został określony wpływ podawania obestatyny na przebieg obrzękowego OZT wywołanego ceruleiną. Obestatyna była podawana 2 razy dziennie w dawce 8 nmol/kg/dawkę i. p., pierwsza dawka po 24 godzinach od ostatniego podania sekretagogu trzustkowego. Obserwacja ciężkości OZT została przeprowadzona po 2, 3, 5, 7 i 10 dniach od zakończenia podawania ceruleiny. Badano identyczne parametry, jak we wcześniejszych etapach badań.

Analiza statystyczna została przeprowadzona testem jednostronnej analizy wariancji (ANOVA), a następnie testem wielokrotnych porównań Tukey'a przy użyciu programu GraphPadPrism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna  $\pm$  standardowy błąd pomiaru (SEM), a wartości  $p < 0,05$  były uznawane za istotne statystycznie.

## V. Wyniki badań

### 1. Pierwszy etap badań: Wpływ wcześniejszego podawania obestatyny na rozwój martwiczno-krwotocznego ostrego zapalenia trzustki

#### 1.1. Zmiany patomorfologiczne

Tabela 1 przedstawia szczegółowe wyniki patomorfologicznej oceny I/R OZT u szczurów, którym podano obestatynę lub roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl). I/R OZT wywołało znamienne statystycznie zmiany w obrazie histopatologicznym narządu w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast wcześniejsze podanie obestatyny łagodziło następny przebieg OZT. Ochronny wpływ peptydu był najwyraźniej widoczny dla dawek 8 lub 16 nmol/kg/dawkę i. p.

Tabela 1. Wpływ podawania obestatyny w dawkach 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę i. p. przed wywołaniem I/R OZT na patomorfologiczne cechy uszkodzenia tkanki trzustki

	OBRZĘK (0-3)	NACIEK ZAPALNY (0-3)	WAKUOLIZACJA (0-3)	MARTWICA (0-3)	WYLEWY KRWAWY (0-3)
<b>KONTROLA</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>I/R OZT</b>	<b>2-3</b>	<b>2</b>	<b>0-1</b>	<b>1</b>	<b>1-2</b>
<b>OB 4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>OB 8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>OB 16</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>OB 4 + I/R OZT</b>	<b>2-3</b>	<b>1-2</b>	<b>0-1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>OB 8 + I/R OZT</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0-1</b>	<b>0-1</b>	<b>0-1</b>
<b>OB 16 + I/R OZT</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0-1</b>	<b>0-1</b>

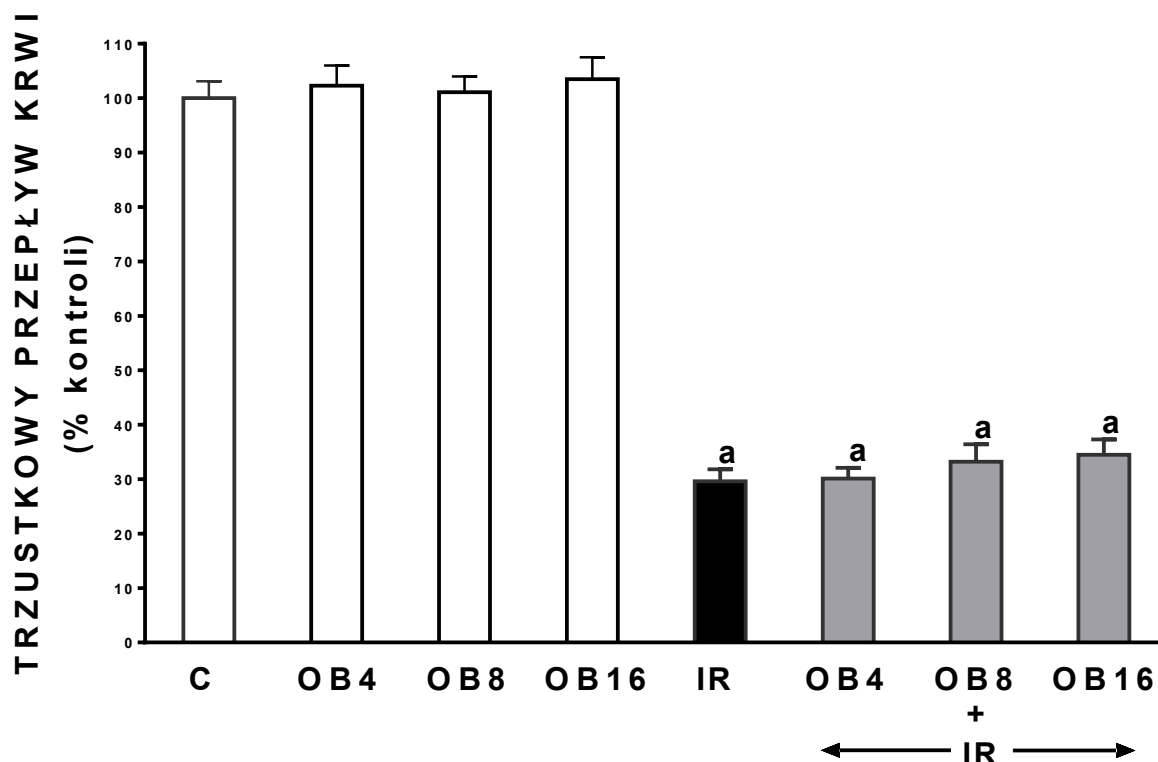
Legenda: OB=obestatyna, wyrażona w nmol/kg/dawkę i. p.

Liczby przedstawiają przeważającą ocenę histologiczną dla danej grupy badanej.



### 1.2. Trzustkowy przepływ krwi

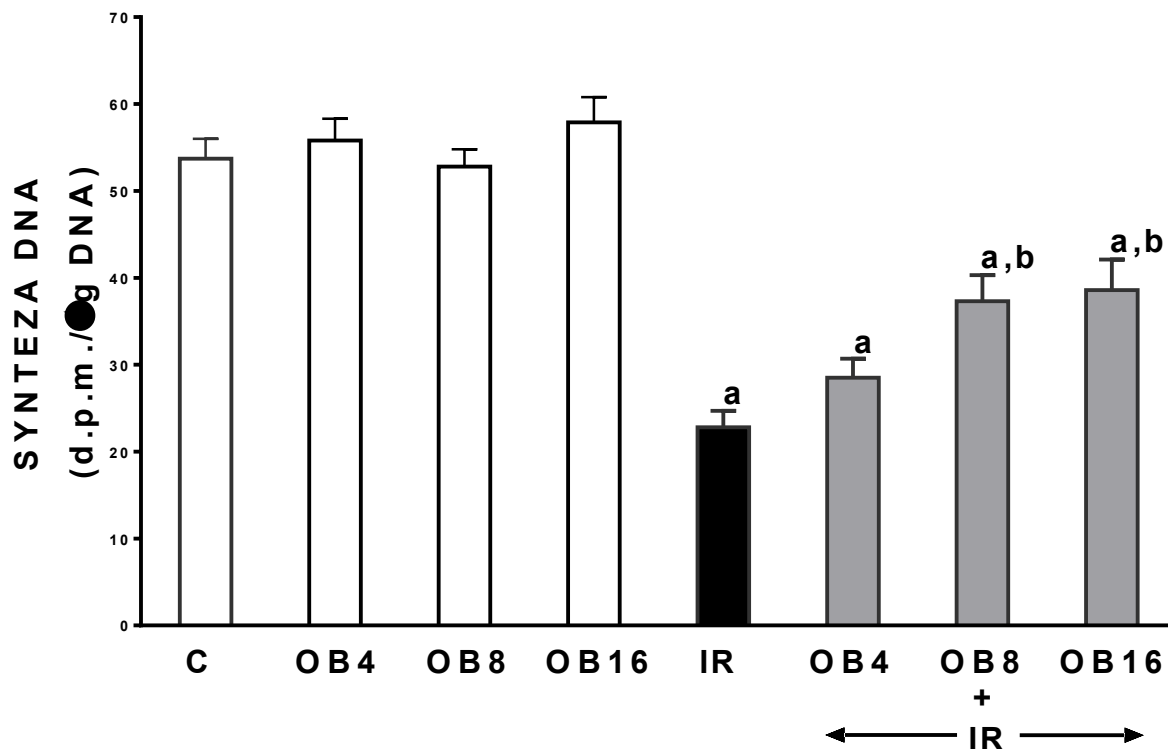
Podawanie obestatyiny szczurom w grupie, w której nie wywoływano OZT, nie miało wpływu na TPK. I/R OZT w sposób zamienny statystycznie obniżyło badany parametr. Natomiast u szczurów z I/R OZT wcześniejsze podanie peptydu pozwalało zahamować jego zmniejszenie. Wpływ ten nie był jednakże statystycznie istotny (Ryc. 1).



Rycina 1. Wpływ podawania obestatyiny w dawkach 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę i. p. przed wywołaniem I/R OZT na TPK. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup>p<0,05 w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup>p<0,05 w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.

### 1.3. Trzustkowa synteza kwasu deoksyrybonukleinowego

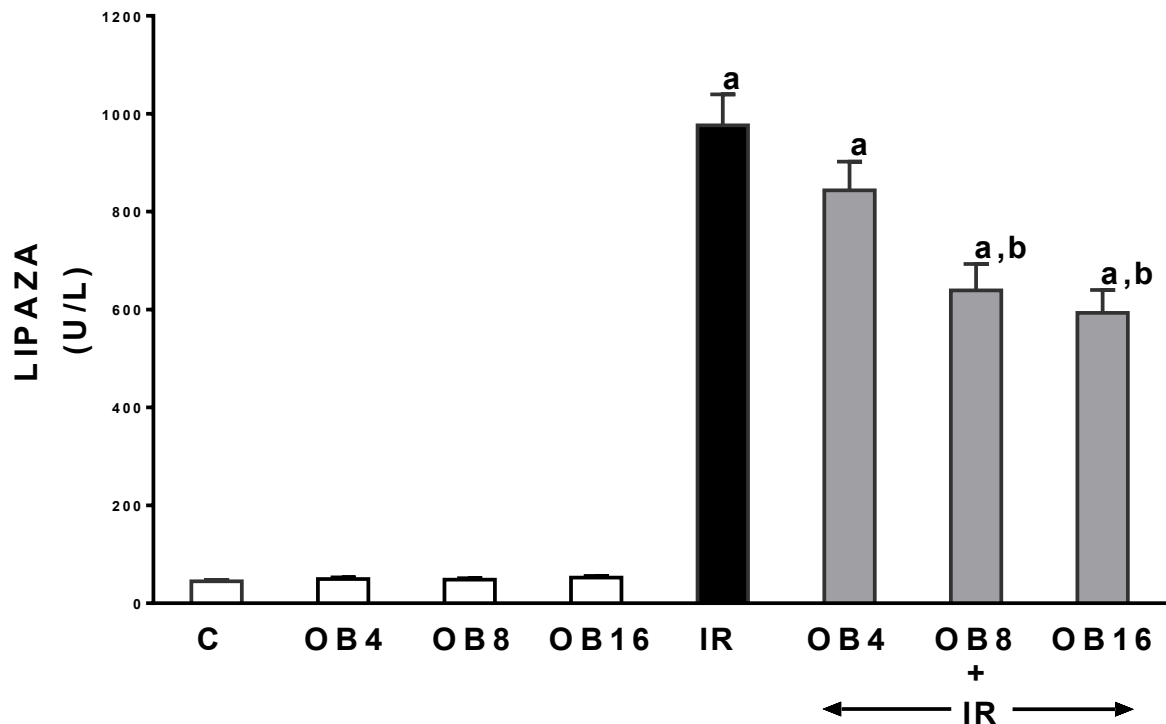
Trzustkowa synteza DNA zmniejszyła się o blisko 59% w grupie zwierząt z wywołanym I/R OZT. W grupie zwierząt, u których nie wywołano OZT nie zaobserwowano po podaniu obestatyiny istotnych zmian w obrębie trzustki w stosunku do grupy kontrolnej. Podanie tego peptydu przed wywołaniem OZT spowodowało częściowe odwrócenie redukcji syntezy DNA wywołanej przez OZT. Efekt ten był najsilniej wyrażony u zwierząt, którym podano obestatinę w dawce 8 i 16 nmol/kg/dawkę i. p (Ryc. 2).



Rycina 2. Wpływ podawania obestatyiny w dawkach 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę przed wywołaniem martwiczo-krwotocznego OZT na syntezę DNA w trzustce. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup>p<0,05 w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup>p<0,05 w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.

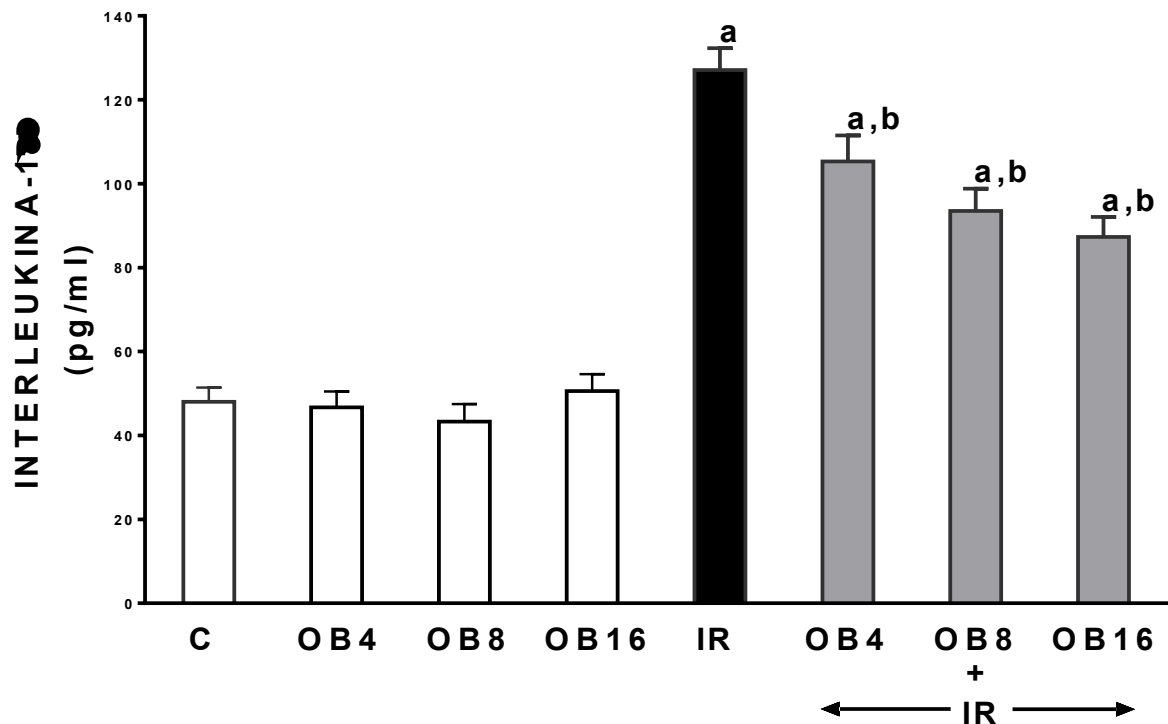
#### 1.4. Poziom aktywności lipazy i stężenia prozapalnej interleukiny-1 $\beta$ w surowicy krwi

Podanie wzrastających dawek obestatyiny nie wpłynęło na aktywność lipazy w grupie kontrolnej. Badania wykazały znamiennej statystycznie 21-krotny wzrost aktywności lipazy surowicy krwi u szczurów z I/R OZT w porównaniu do grupy kontrolnej. Podanie obestatyiny u zwierząt z OZT spowodowało dawkozależny spadek jej aktywności. Dla dawek 8 i 16 nmol/kg/dawkę i. p. efekt ten był statystycznie znamiennej, a obniżenie aktywności tego enzymu trzustkowego wyniosło odpowiednio o 29% i 40% dla poszczególnych dawek (Ryc. 3).



Rycina 3. Wpływ podawania obestatyny w dawkach 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę przed wywołaniem martwiczo-krwotocznego OZT na aktywność lipazy w surowicy. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.

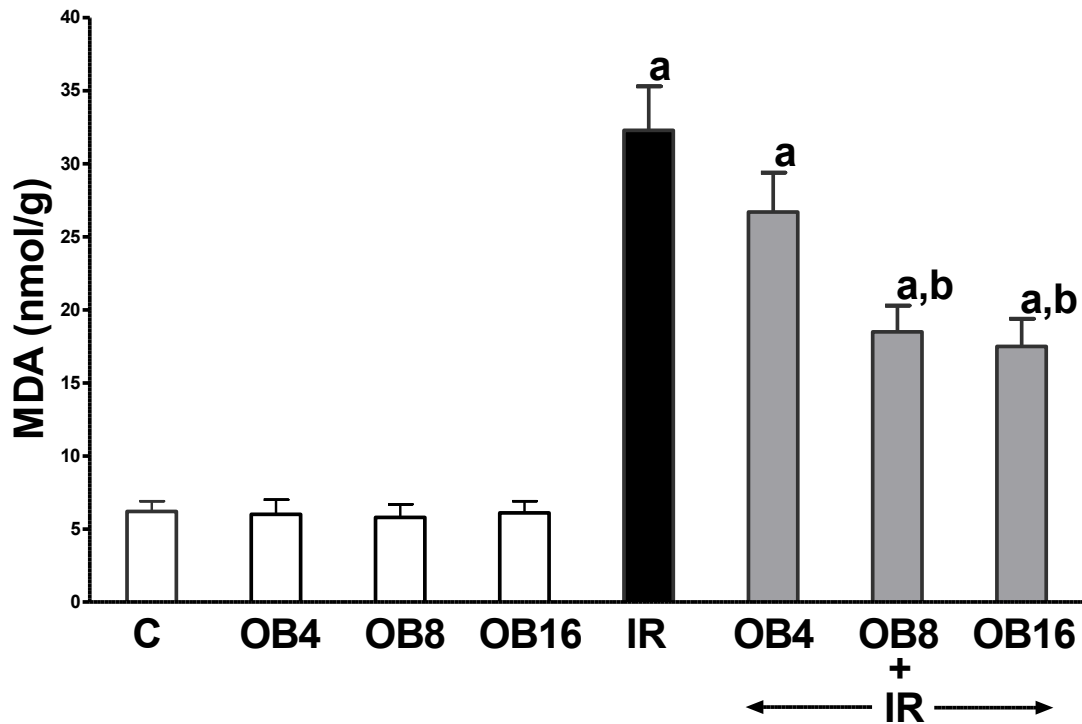
Podobne do aktywności lipazy zmiany obserwowano w odniesieniu do stężenia IL-1 $\beta$  w surowicy krwi. U szczurów z OZT stwierdzono gwałtowny i znamieny wzrost tej prozapalnej cytokiny, a wcześniejsze podanie obestatyny hamowało ten efekt w sposób istotny statystycznie i wprost proporcjonalny do zastosowanej dawki peptydu. Wpływu obestatyny na poziom IL-1 $\beta$  nie stwierdzono u zwierząt bez wywoływania OZT (Ryc. 4).



Rycina 4. Wpływ podawania obestatyiny w dawkach 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę przed wywołaniem martwiczo-krwotocznego OZT na stężenie IL-1 $\beta$  w surowicy. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.

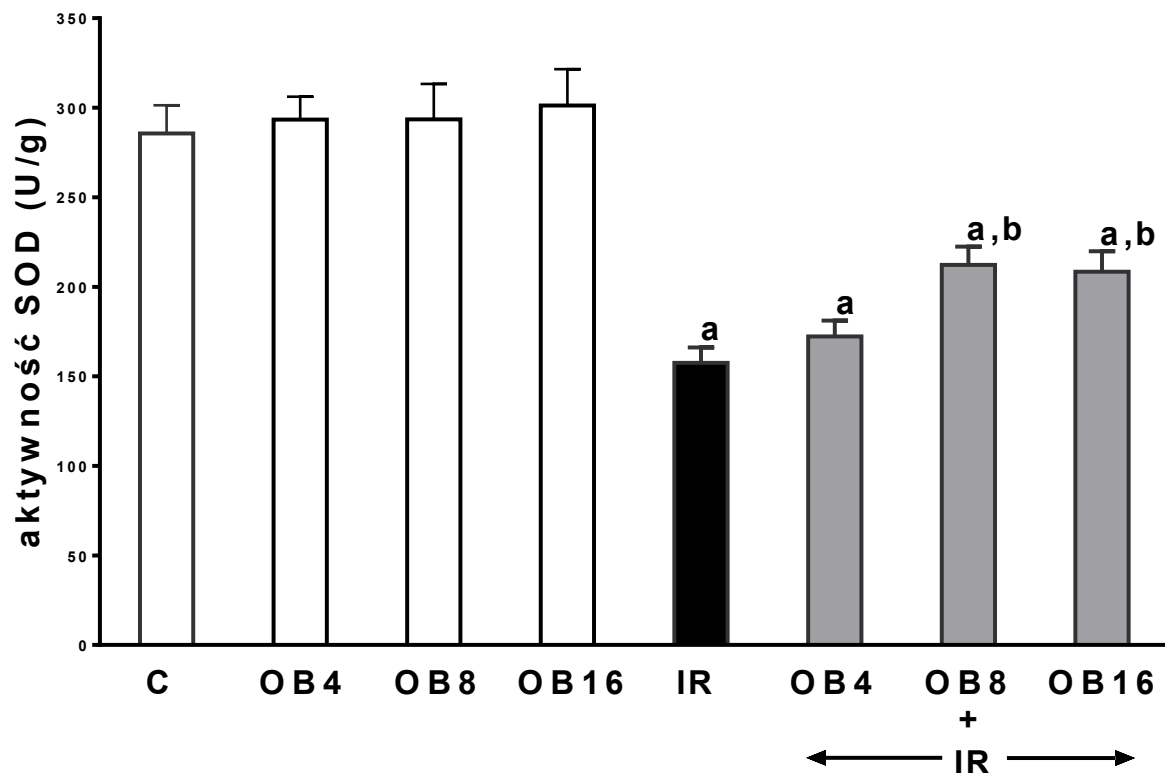
### 1.5. Poziom stresu oksydacyjnego w trzustce wyrażony stężeniem dialdehydu malonowego i aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej

U zwierząt z I/R OZT obserwowano istotny statystycznie, ponad 5-krotny wzrost stężenia MDA w trzustce. Upřednie podanie obestatyiny redukowało ten wzrost w sposób znamieny statystycznie dla dawek 8 i 16 nmol/kg/dawkę i. p. (Ryc. 5).



Rycina 5. Wpływ podawania obestatyny w dawkach 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę przed wywołaniem martwiczo-krwotocznego OZT stężenie MDA w trzustce. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.

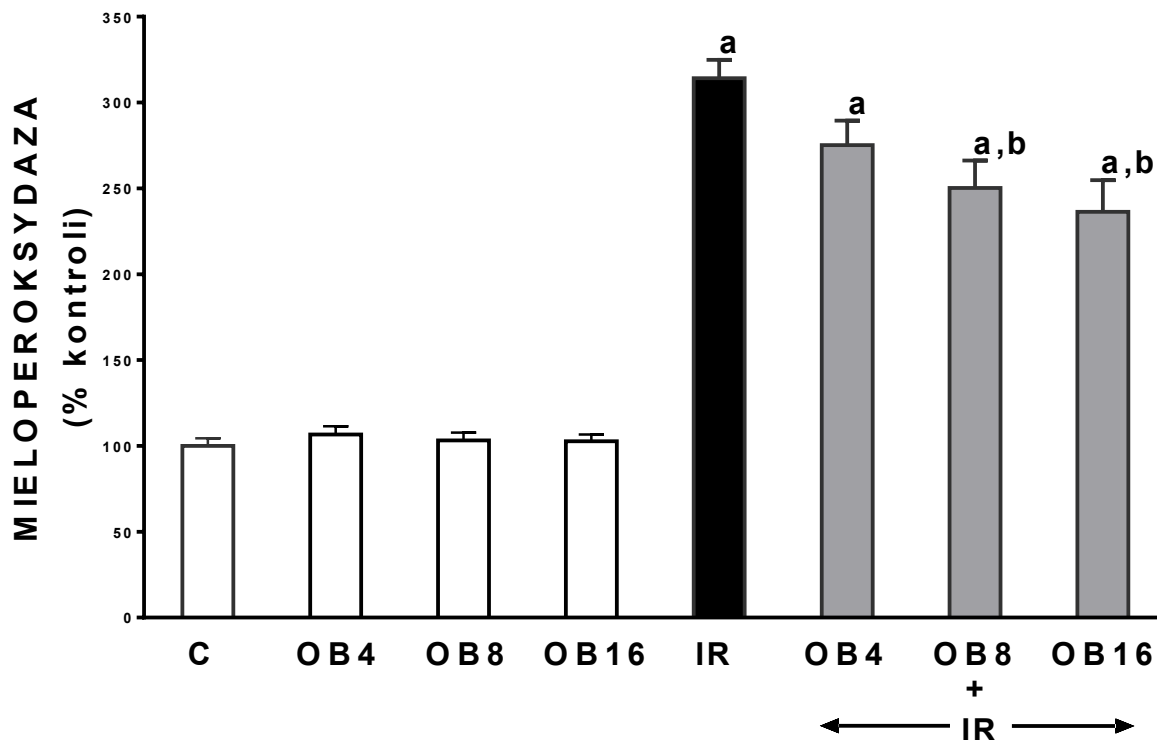
Przeciwstawne obserwacje natomiast dotyczyły aktywności trzustkowej SOD. W wyniku I/R OZT nastąpił znamieny statystycznie spadek aktywności tego enzymu antyoksydacyjnego, podczas gdy uprzednie podanie obestatyny częściowo znosiło ten efekt. Dla dawek 8 i 16 nmol/kg/dawkę i. p. ochronny wpływ tego peptydu na rozwój I/R OZT był znamieny statystycznie (Ryc. 6).



Rycina 6. Wpływ podawania obestatyny w dawkach 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę przed wywołaniem martwiczo-krwotocznego OZT aktywność SOD w trzustce. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.

### 1.6. Aktywność mieloperoksydazy w trzustce

W wyniku I/R OZT następował znaczący wzrost aktywności MPO w tkance trzustki. Podanie obestatyny szczurom bez OZT nie miało wpływu na aktywność tkankowego stężenia tego enzymu. Po poprzednim podaniu obestatyny szczurom z następowym wywołaniem OZT, trzustkowa aktywność MPO była mniejsza w porównaniu do zwierząt z zapaleniem, którym wcześniej nie podano tego peptydu. Ochronny wpływ obestatyny był istotny statystycznie dla dawek 8 i 16 nmol/kg/dawkę i. p. (Ryc. 7).

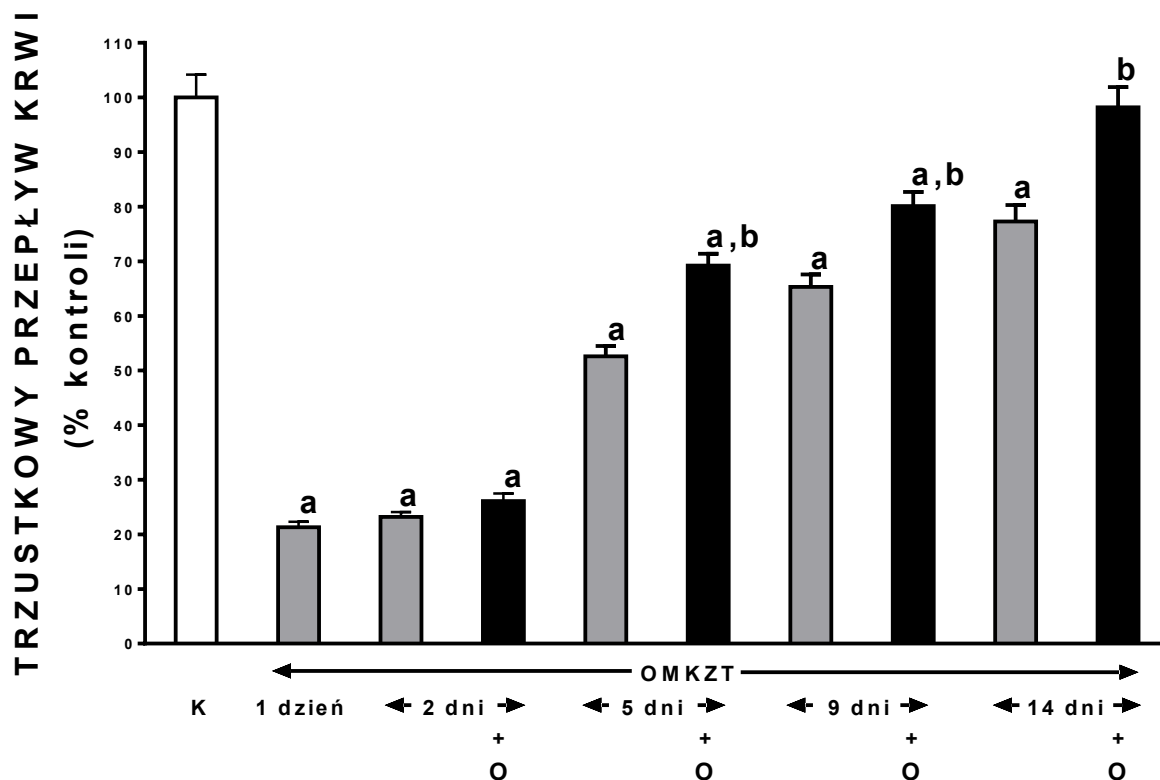


Rycina 7. Wpływ podawania obestatyny w dawkach 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę przed wywołaniem martwiczo-krwotocznego OZT aktywność MPO w trzustce. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt;  $^a p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej;  $^b p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.

## 2. Drugi etap badań: Lecznicy wpływ obestatyny na przebieg martwiczo-krwotocznego ostrego zapalenia trzustki

### 2.1. Trzustkowy przepływ krwi

W porównaniu z grupą bez zapalenia, u zwierząt z I/R OZT w pierwszym dniu obserwacji, następował znaczący, bo o 80% spadek TPK, który normalizował się po upływie 14 dni. W wyniku podania obestatyny, jego poprawa rozpoczynała się już po 5 dniu od R (Ryc. 8).

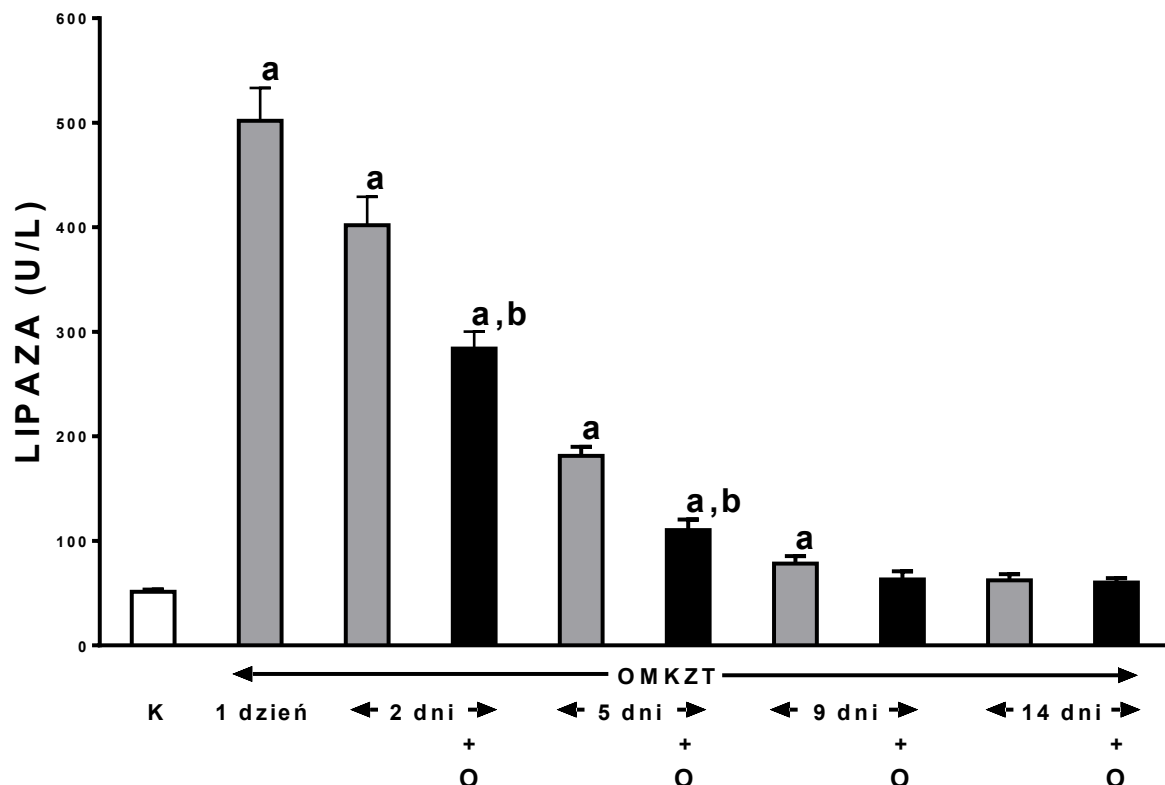


Rycina 8. Wpływ podawania obestatyiny w dawce 8 nmol/kg/dawkę w przebiegu martwiczo-krwotocznego OZT na trzustkowy przepływ krwi. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.

## 2.2. Parametry biochemiczne

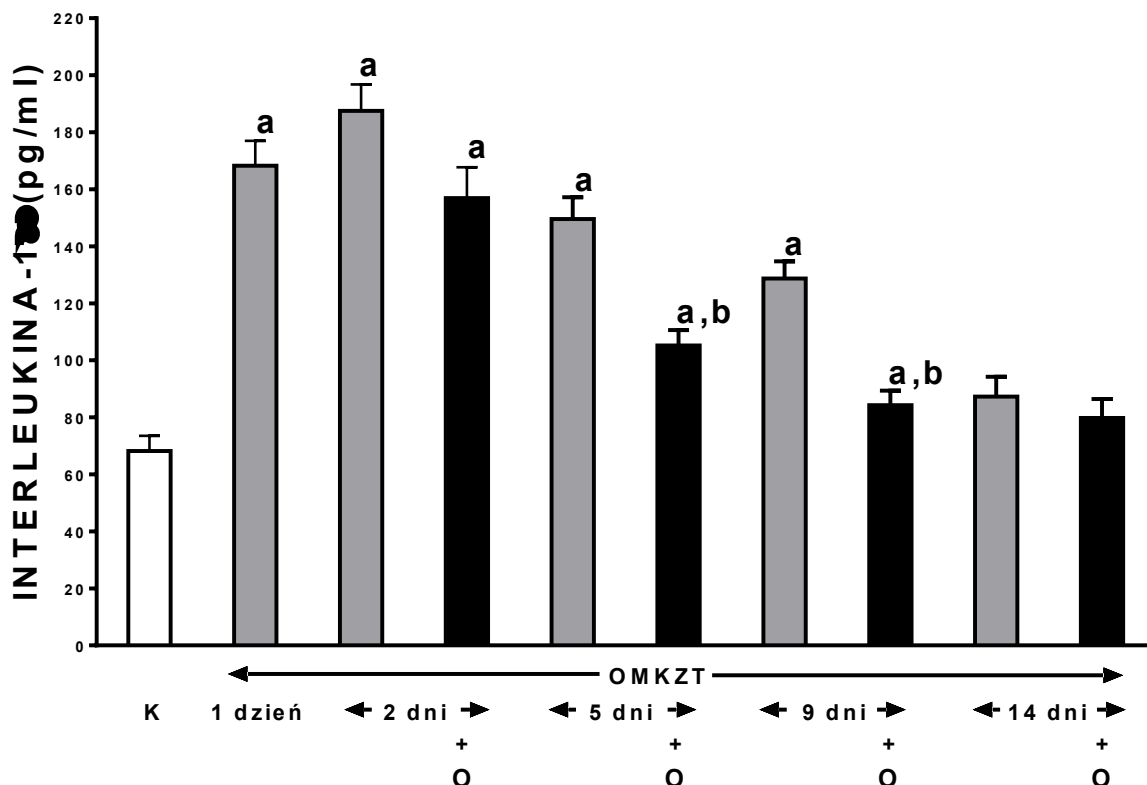
I/R OZT spowodowało znamiennej statystycznie 10-krotny wzrost aktywności lipazy w surowicy krwi w porównaniu z grupą kontrolną. Efekt ten jednakże miał charakter tymczasowy i ulegał spontanicznej normalizacji już po upływie 2 dni, osiągając poziom obserwowany w grupie kontrolnej po 14 dniach. Podawanie obestatyiny po wywołaniu OZT znacząco przyspieszało normalizację poziomu tego enzymu trzustkowego w surowicy, którą obserwowano pomiędzy 2 a 5 dniem, osiągając wartości oznaczane w grupie kontrolnej w dniu 9 badania (Ryc. 9).





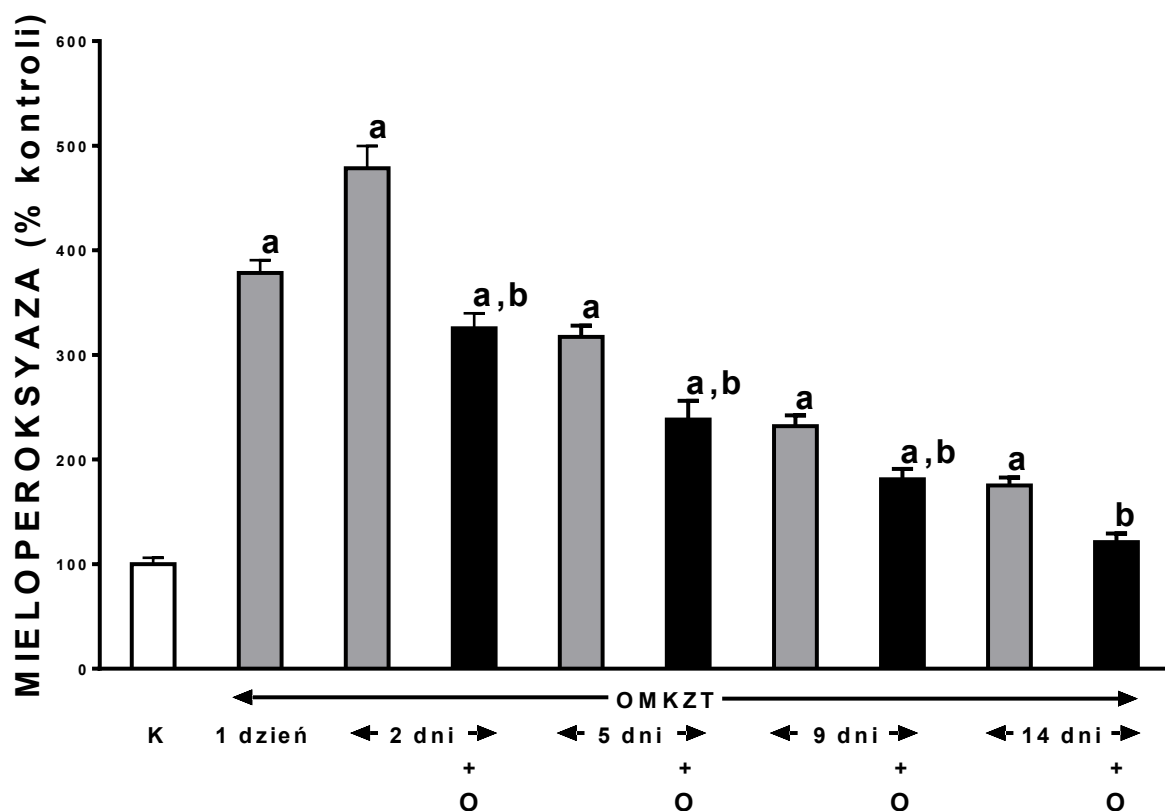
Rycina 9. Wpływ podawania obestatyiny w dawce 8 nmol/kg/dawkę w przebiegu martwiczo-krwotocznego OZT na aktywność lipazy w surowicy. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.

Zmiany stężeń prozapalnej IL-1 $\beta$  w surowicy krwi w przebiegu I/R OZT były podobne, jak te obserwowane w odniesieniu do aktywności lipazy. Stężenie tej cytokiny znamienne statystycznie wzrastało zaraz po wywołaniu OZT, osiągając maksymalnie 3-krotną wartość w porównaniu do grupy kontrolnej w dniu 2 obserwacji, a następnie stopniowo normalizowało się. Obestatyina statystycznie znamienne przyspieszała proces normalizacji poziomu stężenia IL-1 $\beta$  w surowicy, który pojawiał się między 5 a 9 dniem eksperymentu (Ryc. 10).



Rycina 10. Wpływ podawania obestatyiny w dawce 8 nmol/kg/dawkę w przebiegu martwiczo-krwotocznego OZT na stężenie interleukiny-1 $\beta$  w surowicy. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.

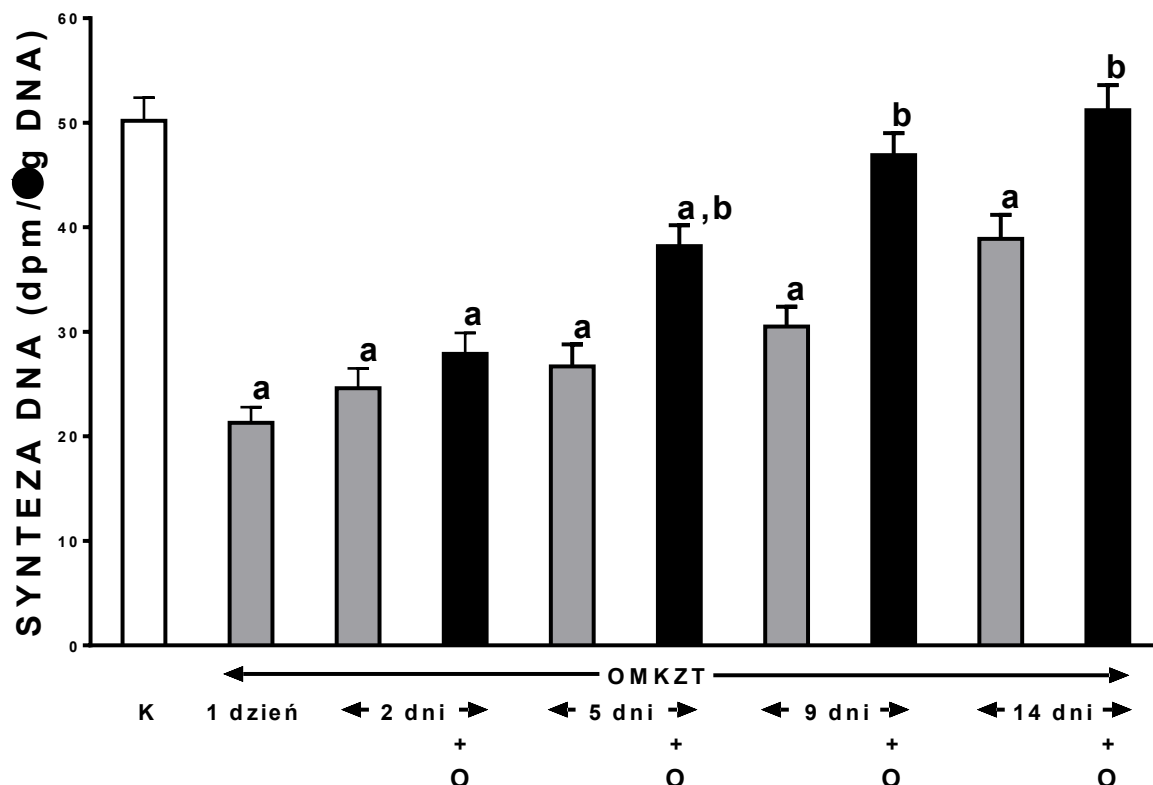
Poziom aktywności trzustkowej MPO znamienne statystycznie wzrastał w wyniku I/R OZT, osiągając maksymalny 5-krotny wzrost wartości w 2 dniu obserwacji. Efekt ten od dnia 5 obserwacji ulegał stopniowej istotnej normalizacji, a podanie obestatyiny znacząco go przyspieszało (Ryc. 11).



Rycina 11. Wpływ podawania obestatyiny w dawce 8 nmol/kg/dawkę w przebiegu martwiczo-krwotocznego OZT na aktywność mieloperoksydazy w trzustce. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.

### 2.3. Trzustkowa synteza kwasu deoksyrybonukleinowego

Trzustkowa synteza DNA jest miarą żywotności oraz zdolności proliferacyjnych, jak i regeneracyjnych komórek pęcherzykowych trzustki. Pod wpływem I/R OZT znamienne statystycznie maleje, a następnie stopniowo wzrasta w miarę upływu czasu. Podawanie obestatyiny w przebiegu OZT odwracało spowodowany zapaleniem spadek trzustkowej syntezy DNA w sposób statystycznie znamienne w okresie pomiędzy dniem 5 a 14 obserwacji (Ryc. 12).



Rycina 12. Wpływ podawania obestatyiny w dawce 8 nmol/kg/dawkę w przebiegu martwiczo-krwotocznego OZT na syntezę DNA w trzustce. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup>p<0,05 w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup>p<0,05 w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.

#### 2.4. Zmiany patomorfologiczne

W tabeli 2 przedstawiono ocenę patomorfologiczną zmian w trzustce szczurów z lub bez I/R OZT, którym podawano sól fizjologiczną lub obestatyinę. 24 godziny od momentu wywołania OZT obserwowano umiarkowane zmiany obrzękowe widoczne pod mikroskopem świetlnym. Towarzyszyły im umiarkowane nacieki okołonaczyniowe oraz nielicznie, rozsiane w obrębie miąższu trzustki nacieki leukocytarne.

Wakuolizację komórek pęcherzykowych stwierdzono w 25 % przypadków. Martwicę obserwowano w mniej niż 15-35 % komórek trzustki. Ponadto u zwierząt z OZT obserwowano od 1 do 5 ognisk krwotocznych na 1 preparat. Z czasem zmiany te spontanicznie ustępowały i w 14 dniu od momentu reperfuzji trzustki obserwowano jedynie obrzęki międzypłacikowe, drobne nacieki okołonaczyniowe i wakuolizację dotyczącą mniej niż 25 % wszystkich komórek pęcherzykowych trzustki.

Podanie obestatyny przyspieszało regenerację zmienionej zapalnie trzustki. U szczurów, którym podano obestatynę nie stwierdzano żadnych, poza drobnymi okołonaczyniowymi naciekami leukocytarnymi, zmian patomorfologicznych trzustki w ostatnim dniu obserwacji.

Tabela 2. Wpływ podawania obestatyny w przebiegu martwiczo-krwotocznego OZT na patomorfologiczne parametry ciężkości zapalenia trzustki wywołanego ostrym niedokrwieniem z następującą reperfuzyją.

	<b>OBRZĘK</b>	<b>NACIEK ZAPALNY</b>	<b>WAKUOLIZACJA</b>	<b>MARTWICA</b>	<b>WYLEWY KRWAWY</b>
	<b>(0-3)</b>	<b>(0-3)</b>	<b>(0-3)</b>	<b>(0-3)</b>	<b>(0-3)</b>
<b>KONTROLA</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>I/R 1 dzień</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1-2</b>	<b>1-2</b>
<b>I/R 2 dni</b>	<b>2</b>	<b>2-3</b>	<b>1-2</b>	<b>1-2</b>	<b>2</b>
<b>I/R 2 dni + OB</b>	<b>1-2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1-2</b>
<b>I/R 5 dni</b>	<b>1-2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0-1</b>
<b>I/R 5 dni + OB</b>	<b>2-3</b>	<b>1-2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>I/R 9 dni</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0-1</b>	<b>0</b>	<b>0-1</b>
<b>I/R 9 dni + OB</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>I/R 14 dni</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0-1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>I/R 14 dni + OB</b>	<b>0</b>	<b>0-1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

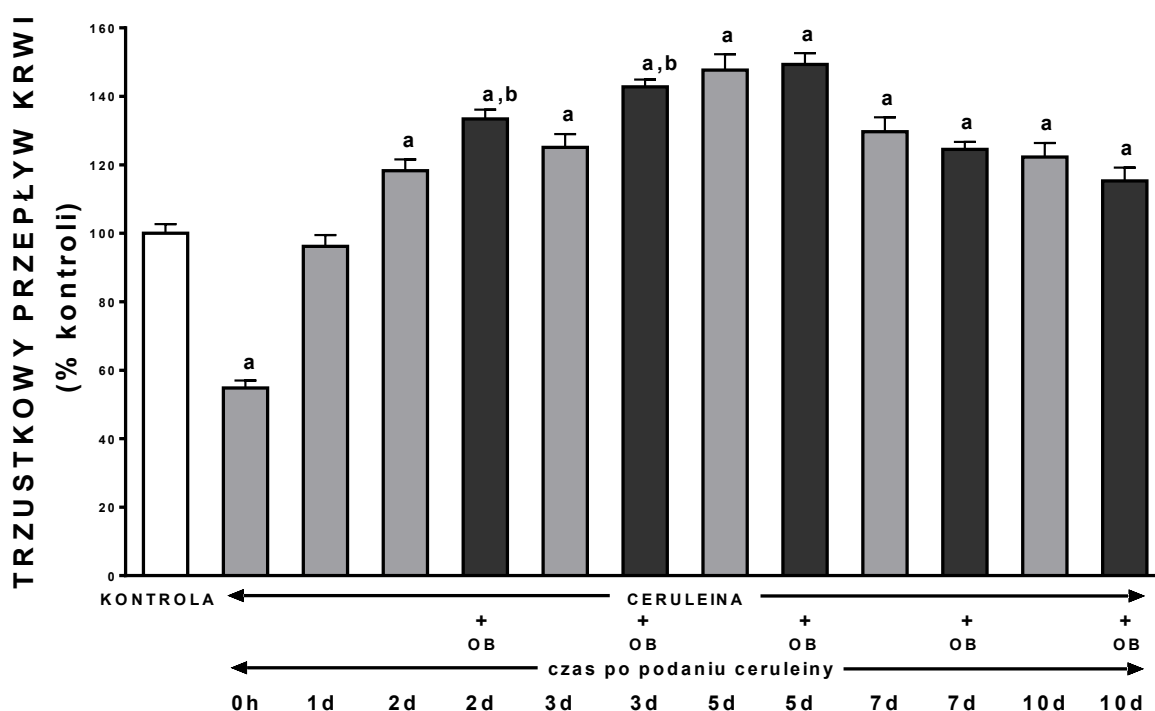
Opis: IR=martwiczo-krwotoczne OZT.

Liczby wyrażają przeważającą ocenę histologiczną dla danej grupy badawczej

### 3. Trzeci etap badań: Wpływ podawania obestatyny na leczenie obrzękowego ostrego zapalenia trzustki o łagodnym przebiegu

#### 3.1. Trzustkowy przepływ krwi

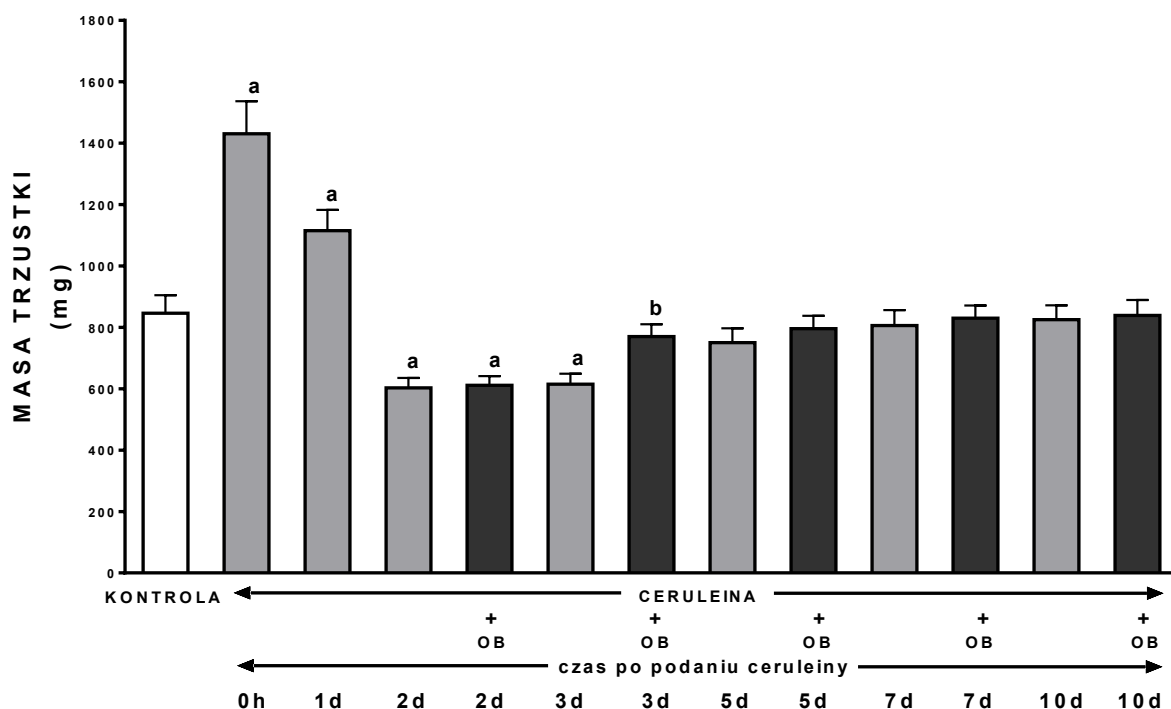
Obrzękowe OZT o łagodnym przebiegu, wywołane przy użyciu ceruleiny, cechowało się znamienym statystycznie, około 45 % spadkiem TPK w porównaniu do grupy kontrolnej. Efekt ten ustępował niemal całkowicie już 2 dnia, a następnie wzrastał, osiągając maksymalne wartości w 5 dniu obserwacji. W 7 dniu od momentu wywołania CZT, TPK stopniowo malał, lecz i tak był znacznie wyższy, niż w grupie kontrolnej w ostatnim, 10 dniu obserwacji. Podawanie obestatyny znamienne statystycznie dodatkowo zwiększało badany parametr podczas pierwszych 3 dni obserwacji a w drugiej fazie CZT przyspieszało jego normalizację, lecz w sposób nieznamienno statystycznie (Ryc. 13).



Rycina 13. Wpływ podawania obestatyny w przebiegu obrzękowego, wywołanego ceruleiną OZT na trzustkowy przepływ krwi. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z obrzękowym OZT w czasie 0 h.

### 3.2. Masa trzustki

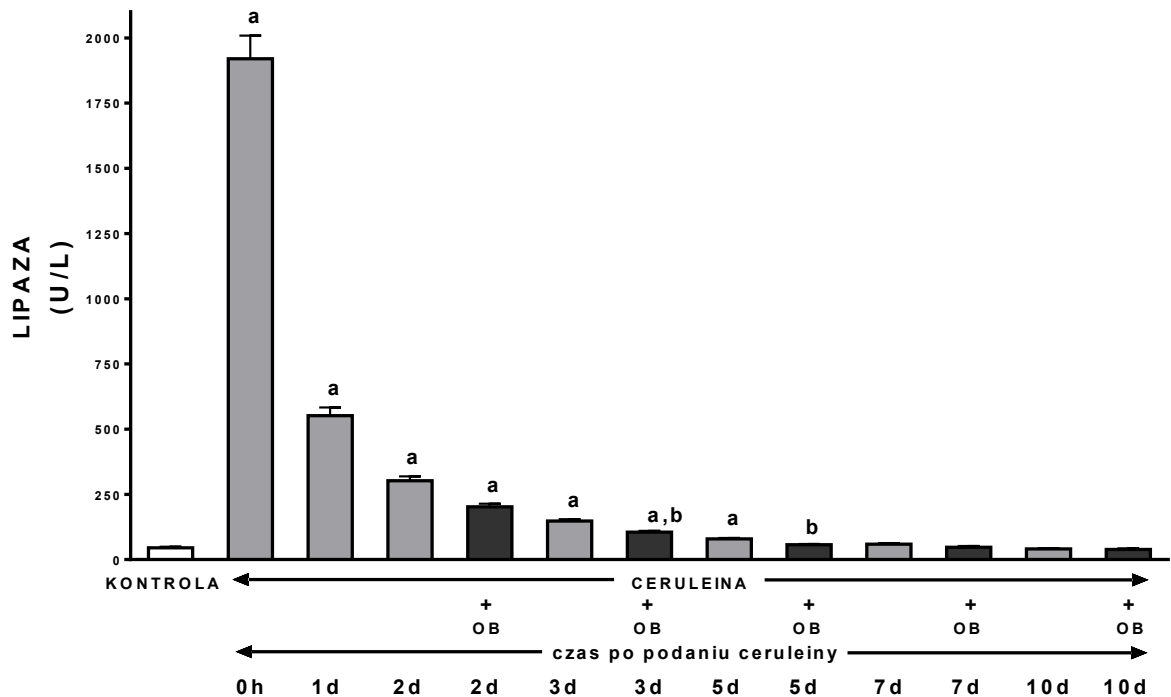
Początkowo, po podaniu ostatniej dawki ceruleiny, masa trzustki istotnie wzrastała o 69 % w porównaniu do grupy kontrolnej, a następnie malała w sposób statystycznie znamienne w 2 dniu obserwacji, liczonym od momentu wywołania CZT, osiągając wartości zbliżone do tych w grupie kontrolnej w 10 dniu badania. Podanie obestatyny przyspieszało powrót do wyjściowej masy trzustki, lecz w sposób nieistotny statystycznie w 3 dniu obserwacji (Ryc. 14).



Rycina 14. Wpływ podawania obestatyny w przebiegu obrzękowego, wywołanego ceruleiną OZT na masę trzustki. Średnia ± SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z obrzękowym OZT w czasie 0 h.

### 3.3. Parametry biochemiczne

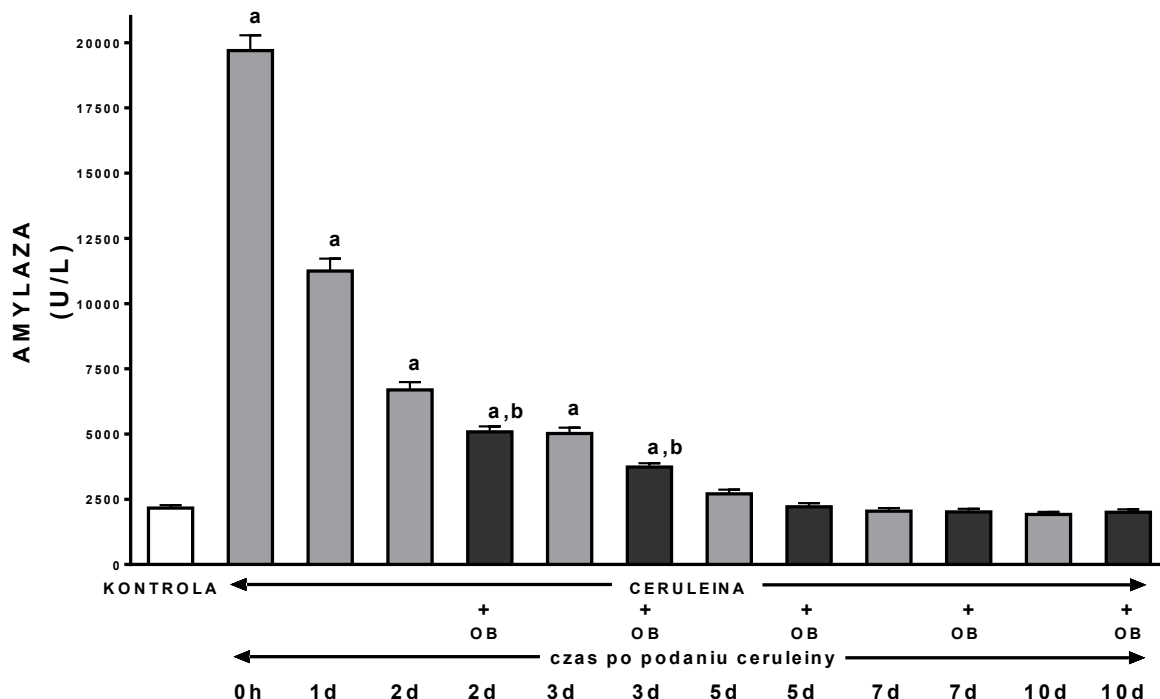
W wyniku CZT następował znamienne statystycznie natychmiastowy, 38-krotny wzrost aktywności lipazy w surowicy, który stopniowo malał, osiągając wartości podobne do obserwowanych w grupie kontrolnej od 7 dnia obserwacji. Wykazano istotne przyspieszenie normalizacji jej aktywności pod wpływem obestatyny (Ryc. 15).



Rycina 15. Wpływ podawania obestatyiny w przebiegu obrzękowego, wywołanego ceruleiną OZT na aktywność lipazy w surowicy. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z obrzękowym OZT w czasie 0 h.

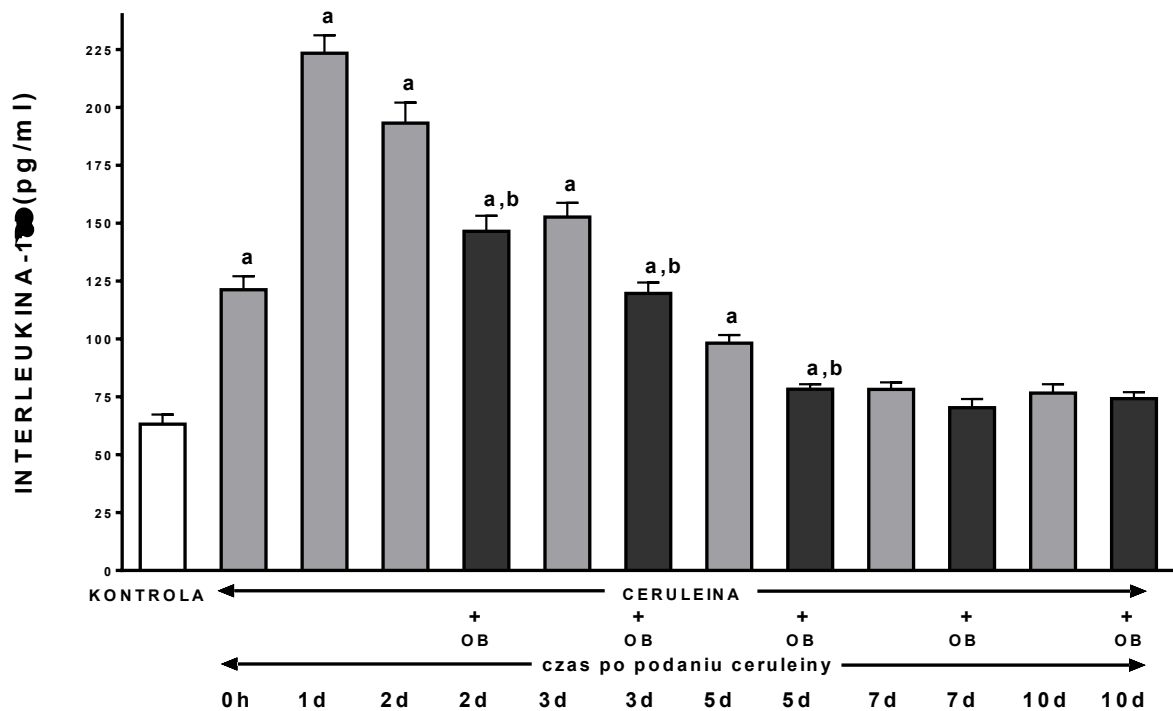
Podobne zmiany obserwowano badając aktywność drugiego enzymu trzustkowego, czyli amylazy w osoczu krwi. Początkowy wzrost aktywności amylazy stopniowo malał wraz z upływem czasu, osiągając wartości z grupy kontrolnej w 5 dniu obserwacji. Normalizacja jej aktywności została przyspieszona po podaniu obestatyiny (Ryc. 16).





Rycina 16. Wpływ podawania obestatyiny w przebiegu obrztkowego, wywołanego ceruleiną OZT na aktywność amylazy w surowicy. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w kaŹdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z obrztkowym OZT w czasie 0 h.

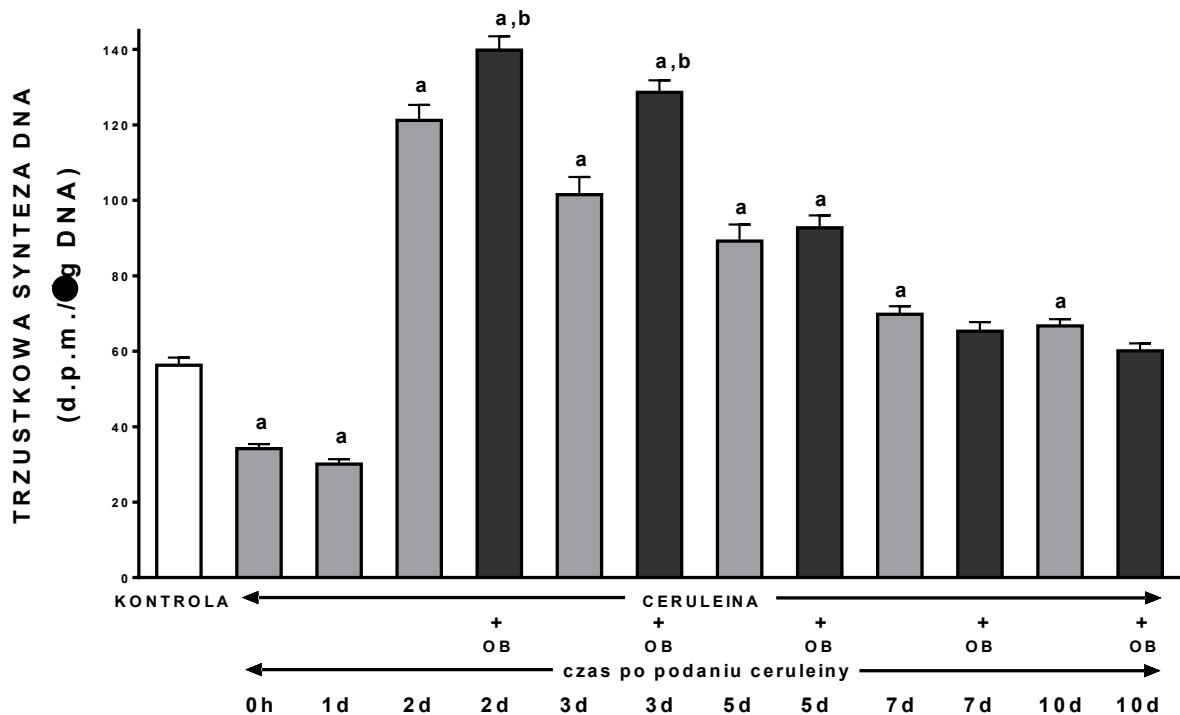
Podobnie do zmian aktywności enzymów trzustkowych w surowicy obserwowano równieŹ zmiany stęŹenia prozapalnej IL-1 $\beta$ . StęŹenie to istotnie statystycznie wzrastało zaraz po wywołaniu CZT, osiagając wartości maksymalne (3,5-krotny wzrost) w 1 dniu obserwacji, a następnie stopniowo ulegało normalizacji. Podawanie obestatyiny przyspieszało ten korzystny efekt, który był statystycznie znamieny w okresie pomiędy 2 a 5 dniem badania (Ryc. 17).



Rycina 17. Wpływ podawania obestatyiny w przebiegu obrztkowego, wywołanego ceruleiną OZT na stężenie IL-1  $\beta$  w surowicy. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p$ <0,05 w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p$ <0,05 w stosunku do grupy zwierząt z obrztkowym OZT w czasie 0 h.

### 3.4. Trzuskowa synteza kwasu deoksyrybonukleinowego

Pod wpływem CZT, następowało nagłe istotne statystycznie zmniejszenie trzuskowej syntezy DNA, która wyrażała zmniejszenie proliferacji i żywotności komórek pęcherzykowych trzustki. Zmiany te ustępowały w sposób naturalny w 1 dniu obserwacji, a następnie ulegały znamienneму nasileniu w 2 dniu, osiągając wartości maksymalne (2-krotny wzrost w stosunku do grupy kontrolnej). W ciągu kolejnych dni pozapalnej regeneracji trzustki synteza DNA ulegała stopniowej istotnej statystycznie normalizacji. Podawanie obestatyiny szczurom z OZT wywołanym ceruleiną znamienne nasilało trzuskową syntezę DNA od 2 dnia obserwacji oraz przyspieszało normalizację syntezy DNA w późniejszej fazie regeneracji trzustki (Ryc. 18).



Rycina 18. Wpływ podawania obestatyny w przebiegu obrzękowego, wywołanego ceruleiną OZT na syntezę DNA w trzustce. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z obrzękowym OZT w czasie 0 h.

### 3.5. Ocena patomorfologiczna

Tabela 3 ilustruje ocenę zmian patomorfologicznych wywołanych CZT u szczurów poddanych działaniu roztworu soli fizjologicznej i/lub obestatyny. Zmiany morfologiczne obserwowane pod mikroskopem świetlnym w trzustce po ostatnim podaniu ceruleiny, to umiarkowane śród- i wewnątrzplacikowe obrzęki, którym towarzyszyły umiarkowane nacieki okołonaczyniowe i drobne mięszone nacieki leukocytarne. Wakuolizację stwierdzano w ponad 50 % wszystkich komórek pęcherzykowych. Nie obserwowano natomiast zmian martwiczych, ani krwotocznych w przebiegu obrzękowego, wywołanego ceruleiną OZT. Z czasem następowało samoistne ustępowanie tych zmian z pozostawieniem jedynie drobnych obrzęków międzyzrazikowych i skąpych nacieków leukocytarnych w obrębie mięszu trzustki w 10 dniu od wywołania OZT. Podawanie obestatyną zmniejszało nasilenie morfologicznych objawów uszkodzenia trzustki i przyspieszało jej pozapalną regenerację. Trzustka zwierząt z obrzękowym OZT, którym podano obestatynę, ulegała całkowitej regeneracji w ciągu 7 dni od wywołania zapalenia.

Tabela 3. Wpływ podawania obestatyny w przebiegu obrzękowego, wywołanego ceruleiną OZT na patomorfologiczne parametry ciężkości zapalenia trzustki.

	OBRZĘK (0-3)	NACIEK ZAPALNY (0-3)	WAKUOLIZACJA (0-3)	MARTWICA (0-3)	WYLEWY KRWAWY (0-3)
<b>KONTROLA</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>CZT 0 h</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>CZT 1 dzień</b>	<b>1</b>	<b>2-3</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0-1</b>
<b>CZT 2 dni</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1-2</b>	<b>0</b>	<b>0-1</b>
<b>CZT 2 dni + OB</b>	<b>0-1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>CZT 3 dni</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>CZT 3 dni + OB</b>	<b>0-1</b>	<b>2</b>	<b>0-1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>CZT 5 dni</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0-1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>CZT 5 dni + OB</b>	<b>0-1</b>	<b>1-2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>CZT 7 dni</b>	<b>0-1</b>	<b>0-1</b>	<b>0-1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>CZT 7 dni + OB</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>CZT 10 dni</b>	<b>0-1</b>	<b>0-1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>CZT 10 dni + OB</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Opis: Liczby wyrażają przeważającą ocenę histologiczną dla danej grupy badawczej

## VI. Podsumowanie i wnioski

Uzyskane wyniki wskazują na uniwersalność ochronnego działania obestatyny na trzustkę a także dowodzą jej leczniczego działania w obydwu zastosowanych modelach eksperymentalnego OZT. Obserwacje te wskazują na potencjalną możliwość zastosowania obestatyny w leczeniu OZT w warunkach klinicznych.

Wnioski zawarte w pracy opublikowanej w *European Journal of Pharmacology* dowodzą, że wcześniejsze podanie obestatyny hamuje rozwój I/R OZT, powstałego w wyniku ostrego niedokrwienia z następową reperfuzją. Ponadto, uwzględniając wcześniej udowodniony ochronny wpływ obestatyny na rozwój obrzękowego OZT wywołanego ceruleiną, dowiedziono, że ochronny wpływ obestatyny na trzustkę ma charakter uniwersalny i nie zależy od pierwotnej przyczyny tego zapalenia.

Wyniki badań opublikowanych w *PLoS ONE* wykazują, że podawanie obestatyny już po wywołaniu I/R OZT łagodzi przebieg tego zapalenia i przyspiesza regenerację trzustki zarówno czynnościową, jak i anatomiczną. Mechanizmy patofizjologiczne, które odpowiadają za to zjawisko są złożone i prawdopodobnie mogą częściowo wynikać z hamowania przez obestatynę procesu zapalnego oraz normalizacji trzustkowej syntezy DNA, jak i TPK. Obserwacje te sugerują możliwość zastosowania w przyszłości obestatyny w leczeniu OZT.

W pracy opublikowanej w *Pancreas* dowiedziono leczniczych właściwości obestatyny w przebiegu OZT o łagodnym przebiegu wywołanego podaniem ceruleiny. Peptyd ten ma prawdopodobnie właściwości przeciwzapalne (zmniejszone uwalnianie IL-1 $\beta$ , zahamowanie naciekania leukocytarnego trzustki), poprawia syntezę DNA w trzustce, jak również TPK.

### Wnioski wynikające z przedstawionych badań

1. Ochronny efekt podawania obestatyny w trakcie rozwoju OZT charakteryzuje się uniwersalnością i występuje niezależnie od pierwotnej przyczyny tego zapalenia.
2. Podawanie obestatyny w trakcie rozwoju OZT wykazuje ochronny wpływ, który może być efektem hamowania powstawania wolnych rodników tlenowych i rozwoju stresu oksydacyjnego.
3. Stosowanie obestatyny w przebiegu OZT ma działanie lecznicze, jak również przyspiesza pozapalną regenerację trzustki.

## VII. Piśmiennictwo

- Carlini, V.P., Schioth, H.B., Debarioglio, S.R., 2007. Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352(4):907-912.
- Ceranowicz, P., Warzecha, Z., Dembiński, A., Cieszkowski, J., Dembiński, M., Sendur, R., Kusnierz-Cabala, B., Tomaszewska, R., Kuwahara, A., Kato, I., 2009. Pretreatment with obestatin inhibits the development of cerulein-induced pancreatitis. *J. Physiol. Pharmacol.* 60(3):95-101.
- Chen, C.Y., Asakawa, A., Fujimiya, M., Lee, S.D., Inui, A., 2009. Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol. Rev.* 61(4):430-481.
- Dembiński, A., Warzecha, Z., Ceranowicz, P., Cieszkowski, J., Pawlik, W.W., Tomaszewska, R., Kuśnierz-Cabala, B., Naskalski, J.W., Kuwahara, A., Kato, I., 2006. Role of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in the protective effect of ghrelin in ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis. *Growth Horm. IGF Res.* 16(5-6):348-356.
- Dembiński, A., Warzecha, Z., Ceranowicz, P., Cieszkowski, J., Dembiński, M., Ptak-Belowska, A., Kuwahara, A., Kato, I., 2011. Administration of obestatin accelerates the healing of chronic gastric ulcers in rats. *Med. Sci. Monit.* 17(8): BR196-200.
- Gourcerol, G., Million, M., Adelson, D.W., Wang, L., Rivier, J., St-Pierre, D.H., Tache, Y., 2006. Lack of interaction between peripheral injection of CCK and obestatin in the regulation of gastric satiety signaling in rodents. *Peptides.* 27(11):2811-2819.
- Granata, R., Settanni, F., Gallo, D., Trovato, L., Biancone, L., Cantaluppi, V., Nano, R., Annunziata, M., Campiglia, P., Arnoletti, E., Ghè, C., Volante, M., Papotti, M., Muccioli, G., Ghigo, E., 2008. Obestatin promotes survival of pancreatic beta-cells and human islets and induces expression of genes involved in the regulation of beta-cell mass and function. *Diabetes.* 57(4):967-979.
- Hammer, H.F., 2014. An update on pancreatic pathophysiology (Do we have to rewrite pancreatic pathophysiology?) *Wien. Med. Wochenschr.* 164(3-4):57-62.
- 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., 2007. GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology.* 148(1), 13-20.

- Kapica, M., Zabielska, M., Puzio, I., Jankowska, A., Kato, I., Kuwakara, A., Zabielska, R., 2007. Obestatin stimulates the secretion of pancreatic juice enzymes through a vagal pathway in anaesthetized rats - preliminary results. *J. Physiol. Pharmacol.* 58(Suppl. 3):123-130.
- Lacquaniti, A., Donato, V., Chirico, V., Buemi, A., Buemi, M., 2011. Obestatin: an interesting but controversial gut hormone. *Ann. Nutr. Metab.* 59(2-4):193-199.
- Li, J.B., Asakawa, A., Cheng, K., Li, Y., Chaolu, H., Tsai, M., Inui, A., 2011. Biological effects of obestatin. *Endocrine.* 39(3):205-211.
- Pamukcu, O., Kumral, Z.N., Ercan, F., Yegen, B.C., Ertem, D., 2013. Anti-inflammatory effect of obestatin and ghrelin in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 57(2):211-218.
- Plusczyk, T., Witzel, B., Menger, M.D., Schilling, M., 2003. ETA and ETB receptor function in pancreatitis-associated microcirculatory failure, inflammation, and parenchymal injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285(1):G145-G153.
- Samson, W.K., White, M.M., Price, C., Ferguson, A.V., 2007. Obestatin acts in brain to inhibit thirst. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292(1):R637-R643.
- Samson, W.K., Yosten, G.L., Chang, J.K., Ferguson, A.V., White, M.M., 2008. Obestatin inhibits vasopressin secretion: evidence for a physiological action in the control of fluid homeostasis. *J. Endocrinol.* 196(30):559-564.
- Szentirmai, E., Krueger, J.M., 2006. Obestatin alters sleep in rats. *Neurosci. Lett.* 404(1-2):222-226.
- Trovato, L., Gallo, D., Settanni, F., Gesmundo, I., Ghigo, E., Granata, R., 2014. Obestatin: is it really doing something? *Front. Horm. Res.* 42:175-185.
- Working Group IAP/APA Acute Pancreatitis Guidelines. 2013. IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis. *Pancreatology.* 13(4 Suppl 2): e1-15. Doi:10.1016/j.pan.2013.07.063.
- Yadav, D., Lowenfels, A.B., 2013. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 144(6):1252-1261.
- Zhang, J.V., Ren, P.G., Avsian-Kretchmer, O., Luo, C.W., Rauch, R., Klein, C., Hsueh, A.J., 2005. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science.* 310(5750):996-999.

## VIII. Spis tabel i rycin

### Spis tabel

- Tabela 1. Wpływ podawania obestatyny w dawkach 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę i. p. przed wywołaniem I/R OZT na patomorfologiczne cechy uszkodzenia tkanki trzustki.....13
- Tabela 2. Wpływ podawania obestatyny w przebiegu martwiczo-krwotocznego OZT na patomorfologiczne parametry ciężkości zapalenia trzustki wywołanego ostrym niedokrwieniem z następującą reperfuzyją.....26
- Tabela 3. Wpływ podawania obestatyny w przebiegu obrzękowego, wywołanego ceruleiną OZT na patomorfologiczne parametry ciężkości zapalenia trzustki....33

### Spis rycin

- Rycina 1. Wpływ podawania obestatyny w dawkach 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę i. p. przed wywołaniem I/R OZT na TPK. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.....14
- Rycina 2. Wpływ podawania obestatyny w dawkach 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę przed wywołaniem martwiczo-krwotocznego OZT na syntezę DNA w trzustce. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.....15
- Rycina 3. Wpływ podawania obestatyny w dawkach 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę przed wywołaniem martwiczo-krwotocznego OZT na aktywność lipazy w surowicy. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.....16
- Rycina 4. Wpływ podawania obestatyny w dawkach 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę przed wywołaniem martwiczo-krwotocznego OZT na stężenie IL-1 $\beta$  w surowicy. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.....17
- Rycina 5. Wpływ podawania obestatyny w dawkach 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę przed wywołaniem martwiczo-krwotocznego OZT stężenie MDA w trzustce. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.....18



- Rycina 6. Wpływ podawania obestatyny w dawkach 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę przed wywołaniem martwiczo-krwotocznego OZT aktywność SOD w trzustce. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.....19
- Rycina 7. Wpływ podawania obestatyny w dawkach 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę przed wywołaniem martwiczo-krwotocznego OZT aktywność MPO w trzustce. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.....20
- Rycina 8. Wpływ podawania obestatyny w dawce 8 nmol/kg/dawkę w przebiegu martwiczo-krwotocznego OZT na trzustkowy przepływ krwi. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.....21
- Rycina 9. Wpływ podawania obestatyny w dawce 8 nmol/kg/dawkę w przebiegu martwiczo-krwotocznego OZT na aktywność lipazy w surowicy. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.....22
- Rycina 10. Wpływ podawania obestatyny w dawce 8 nmol/kg/dawkę w przebiegu martwiczo-krwotocznego OZT na stężenie interleukiny-1 $\beta$  w surowicy. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.....23
- Rycina 11. Wpływ podawania obestatyny w dawce 8 nmol/kg/dawkę w przebiegu martwiczo-krwotocznego OZT na aktywność mieloperoksydazy w trzustce. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.....24
- Rycina 12. Wpływ podawania obestatyny w dawce 8 nmol/kg/dawkę w przebiegu martwiczo-krwotocznego OZT na syntezę DNA w trzustce. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z martwiczo-krwotocznym OZT.....25
- Rycina 13. Wpływ podawania obestatyny w przebiegu obrzękowego, wywołanego ceruleiną OZT na trzustkowy przepływ krwi. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p < 0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z obrzękowym OZT w czasie 0 h.....27

- Rycina 14. Wpływ podawania obestatyny w przebiegu obrzękowego, wywołanego ceruleiną OZT na masę trzustki. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p<0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p<0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z obrzękowym OZT w czasie 0 h.....28
- Rycina 15. Wpływ podawania obestatyny w przebiegu obrzękowego, wywołanego ceruleiną OZT na aktywność lipazy w surowicy. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p<0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p<0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z obrzękowym OZT w czasie 0 h.....29
- Rycina 16. Wpływ podawania obestatyny w przebiegu obrzękowego, wywołanego ceruleiną OZT na aktywność amylazy w surowicy. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p<0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p<0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z obrzękowym OZT w czasie 0 h.....30
- Rycina 17. Wpływ podawania obestatyny w przebiegu obrzękowego, wywołanego ceruleiną OZT na stężenie IL-1  $\beta$  w surowicy. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p<0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p<0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z obrzękowym OZT w czasie 0 h.....31
- Rycina 18. Wpływ podawania obestatyny w przebiegu obrzękowego, wywołanego ceruleiną OZT na syntezę DNA w trzustce. Średnia  $\pm$  SEM, N=10 w każdej grupie zwierząt; <sup>a</sup> $p<0,05$  w stosunku do grupy kontrolnej; <sup>b</sup> $p<0,05$  w stosunku do grupy zwierząt z obrzękowym OZT w czasie 0 h.....32

## IX. Publikacje składające się na pracę doktorską

1. Bukowczan J., Warzecha Z., Ceranowicz P., Kuśnierz-Cabala B., Tomaszewska R., Dembiński A. Pretreatment with obestatin reduces the severity of ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2015;760:113-121. doi:10.1016/j.ejphar.2015.04.016.
2. Bukowczan J., Warzecha Z., Ceranowicz P., Kuśnierz-Cabala B., Tomaszewska R. Obestatin accelerates the recovery in the course of ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis in rats. *PLoS One* 10(7):e0134380. DOI: 10.1371/journal.pone.0134380. eCollection 2015.
3. Bukowczan J., Cieszkowski J., Warzecha Z., Ceranowicz P., Kuśnierz-Cabala B., Tomaszewska R., Dembiński A. Therapeutic effect of obestatin in the course of cerulein-induced acute pancreatitis. *Pancreas* 2015. Oct. 15 DOI: 10.1097/MPA.0000000000000517. PMID: 26474436.