

*Streszczenie pracy doktorskiej lek. Aleksandry Matuszyk pt.: „The influence of administration of ghrelin gene encoded peptides on colonic mucosa damage induced by acetic acid”*

Grelina i obestatyna, będące polipeptydami pochodzącymi z preprogreliny, wykazują działanie ochronne i lecznicze w przewodzie pokarmowym. Zastosowanie greliny i obestatyny przed wywołaniem ostrego zapalenia trzustki, hamuje rozwój tego zapalenia. Podawanie greliny i obestatyny po wywołaniu ostrego zapalenia trzustki, przyspiesza jego leczenie. W przypadku żołądka, wcześniejsze podanie greliny ogranicza uszkodzenia błony śluzowej tego narządu wywoływane przez etanol, działanie stresu, czy też podanie alendronianów. Ponadto grelina przyspiesza gojenie uszkodzeń błony śluzowej żołądka i dwunastnicy, a obestatyna przyspiesza leczenie wrzodów żołądka wywołanych kwasem octowym oraz podobnie, jak grelina przyspiesza leczenie zapalenia jelita grubego wywołanego za pomocą roztworu dekstranu sodu. Celem prezentowanych badań było: (1) określenie efektu wcześniejszego podania greliny na rozwój zapalenia jelita grubego wywoływanego kwasem octowym; (2) określenie efektu wcześniejszego podania obestatyny na rozwój zapalenia jelita grubego wywoływanego kwasem octowym; (3) określenie wpływu podawania obestatyny na przebieg, wywołanego kwasem octowym, zapalenia jelita grubego.

**Material i Metody:** Badania zostały przeprowadzone w trzech seriach eksperymentów na szczurach płci męskiej rasy Wistar. Pierwsza seria badań miała na celu określenie wpływu poprzedzającego podania greliny na rozwój zapalenia jelita grubego wywołanego kwasem octowym. Zwierzęta otrzymywały dwukrotnie dootrzewnowo sól fizjologiczną (kontrola) lub grelinę w dawce 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę. Pierwsze podanie soli lub greliny miało miejsce 8 godzin przed wywołaniem zapalenia jelita grubego, drugie po 7 godzinach od pierwszego podania. Zapalenie jelita grubego było wywoływane poprzez doodbytnicze podanie 1 ml 4% roztworu kwasu octowego. Jedną lub 24 godziny po wywołaniu zapalenia jelita grubego, zwierzęta były znieczulane. Po otwarciu jamy brzusznej i ekspozycji jelita grubego, badano przepływ krwi przez błonę śluzową tego jelita i mierzono powierzchnię uszkodzeń błony śluzowej. Następnie pobierano wycinki błony śluzowej jelita do badań histologicznych i biochemicznych.

Druga seria badań miała na celu określenie wpływu poprzedzającego podania obestatyny na rozwój zapalenia jelita grubego wywołanego kwasem octowym. Zwierzęta otrzymywały dwukrotnie dootrzewnowo sól fizjologiczną (kontrola) lub obestatynę w dawce 4, 8 lub 16 nmol/kg/dawkę. Pierwsze podanie soli lub obestatyny miało miejsce 8 godzin przed wywołaniem zapalenia jelita grubego, drugie po 7 godzinach od pierwszego podania. Zapalenie jelita grubego było wywoływane poprzez doodbytnicze podanie 1 ml 4% roztworu kwasu octowego. Jedną lub 24 godziny po wywołaniu zapalenia jelita grubego, zwierzęta były znieczulane. Po otwarciu jamy brzusznej i ekspozycji jelita grubego, badano

przepływ krwi przez błonę śluzową tego jelita i mierzono powierzchnię uszkodzeń błony śluzowej. Następnie pobierano wycinki błony śluzowej jelita do badań histologicznych i biochemicznych.

Trzecia seria badań miała na celu określenie wpływu podawania obestatyny na przebieg zapalenia jelita grubego wywołanego kwasem octowym. Zapalenie jelita grubego wywoływano poprzez doodbytnicze podanie 1 ml 3,5% roztworu kwasu octowego. Sól fizjologiczną lub obestatynę w dawce 8 nmol/kg/dawkę podawano dootrzewnowo dwa razy dziennie. Pierwszą dawkę soli lub obestatyny podawano po 24 godzinach od doodbytniczego podania kwasu octowego. Po 7 lub 14 dniach od wywołania zapalenia jelita grubego zwierzęta były znieczulane, mierzono przepływ krwi przez błonę śluzową jelita grubego, a następnie pobierano próbki błony śluzowej do oceny biochemicznej.

**Wyniki:** Pierwszy etap badań wykazał, że doodbytnicze podanie kwasu octowego wywołuje zapalenie jelita grubego u wszystkich zwierząt. Uszkodzenie ściany jelita było widoczne w ocenie makro- i mikroskopowej. Efektowi temu towarzyszyło zmniejszenie przepływu krwi i syntezy DNA w błonie śluzowej jelita grubego. Obserwowany był też, w błonie śluzowej jelita grubego, wzrost stężenia prozapalnej interleukiny-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i dialdehydu malonowego (MDA) oraz wzrost aktywności mieloperoksydazy. Ponadto 6 dochodziło do zmniejszenia aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Wcześniejsze podanie greliny zmniejszało powierzchnię uszkodzeń i ich ciężkość. Efektowi temu towarzyszyła poprawa przepływu krwi, syntezy DNA i aktywności SOD w błonie śluzowej jelita grubego. Ponadto podanie greliny zmniejszało w błonie śluzowej stężenie IL-1 $\beta$  i MDA oraz aktywność mieloperoksydazy.

Drugi etap badań wykazał, że podobnie, jak w etapie pierwszym, doodbytnicze podanie kwasu octowego wywołuje zapalenie jelita grubego u wszystkich zwierząt. Widocznemu w ocenie makro- i mikroskopowej uszkodzeniu ściany jelita, towarzyszyło zmniejszenie przepływu krwi i syntezy DNA w błonie śluzowej. Obserwowany był też, w błonie śluzowej jelita grubego, wzrost stężenia prozapalnej interleukiny-1 $\beta$  oraz wzrost aktywności mieloperoksydazy. Wcześniejsze podanie obestatyny zmniejszało powierzchnię uszkodzeń i ich ciężkość. Efektowi temu towarzyszyła poprawa przepływu krwi i syntezy DNA w błonie śluzowej jelita grubego. Ponadto podanie obestatyny zmniejszało w błonie śluzowej stężenie IL-1 $\beta$  oraz aktywność mieloperoksydazy.

Trzeci etap badań wykazał, że błona śluzowa jelita grubego, po wywołaniu jej zapalenia przy użyciu kwasu octowego, podlega spontanicznemu gojeniu. Powierzchnia uszkodzeń pomiędzy 7. i 14. dniem od podania kwasu, ulegała zmniejszeniu o około 60%. Podawanie obestatyny przez 6 dni przyspieszało gojenie błony śluzowej jelita grubego, zmniejszając znamienne statystycznie powierzchnię uszkodzenia ściany jelita grubego. Powodowało również poprawę syntezy DNA i przepływu krwi przez błonę śluzową tego jelita. Efektowi temu towarzyszyło zmniejszenie śluzówkowego stężenia IL-1 $\beta$  i aktywności mieloperoksydazy. Podawanie obestatyny przez 13 dni powodowało pełną regenerację błony

śluzowej jelita grubego. Efektowi temu towarzyszyło przywrócenie prawidłowego przepływu krwi przez błonę śluzową i zachodzącej w niej syntezy DNA, jak też znamienne zmniejszenie śluzówkowego stężenia IL-1 $\beta$  i aktywności mieloperoksydazy.

**Wnioski:** (1) *Grelina i obestatina działają ochronnie na jelito grube chroniąc go przed rozwojem zapalenia wywołanego kwasem octowym;* (2) Podawanie obestatyny wykazuje działanie lecznicze w przebiegu zapalenia jelita grubego wywołanego kwasem octowym oraz przyspiesza jego pozapalną regenerację; (3) To ochronne działanie peptydów kodowanych przez gen greliny jest związane, przynajmniej w części, z poprawą przepływu krwi i żywotności komórek błony śluzowej jelita grubego, ze zmniejszeniem uwalniania prozapalnej interleukiny-1 $\beta$ , jak też może być efektem hamowania powstawania wolnych rodników tlenowych.

**Słowa kluczowe:** grelina, obestatina, zapalenie jelita grubego wywołane kwasem octowym, synteza DNA, interleukina 1-

## **SUMMARY**

Ghrelin and obestatin, which are polypeptides derived from preproghrelin, have been primarily shown to exhibit a protective and therapeutic effect in the digestive tract. Pretreatment with ghrelin and obestatin inhibits the development of acute pancreatitis. Administration of ghrelin and obestatin after the induction of acute pancreatitis accelerates pancreatic recovery in the course of this disease. In the stomach, pretreatment with ghrelin reduces gastric mucosal damage induced by ethanol, stress or alendronate, as well as accelerates the healing of acetic-acid-induced gastric and duodenal ulcer. Obestatin accelerates the healing of gastric ulcer induced by acetic acid and, like ghrelin, accelerates the treatment of colitis induced by dextran sodium solution. The aims of the presented study were the following: (1) to investigate the effect of pretreatment with ghrelin on the development of acetic-acid-induced colitis; (2) to investigate the effect of pretreatment with obestatin on the development of acetic-acid-induced colitis; (3) to assess the influence of obestatin administration on the course of acetic-acid-induced colitis.

**Materials and Methods:** The study was performed in three separate series of experiments on male Wistar rats. In the first series of experiments concerning the influence of pretreatment with ghrelin on the development of acetic-acid-induced colitis, rats were treated twice intraperitoneally with saline (control) or ghrelin (4, 8 or 16 nmol/kg/dose). The first dose of saline or ghrelin was given 8 h before the induction of colitis, the second 7 h after the first dose. Colitis was induced by a rectal enema of 1 ml of 4% solution of acetic acid. One or 24 h after the induction of colitis the rats were anesthetized. After laparotomy, colonic mucosal blood flow and the area of colonic mucosa damage were measured. Biopsy samples of colonic mucosa were taken for histological and biochemical examination.

In the second series of experiments concerning the influence of pretreatment with obestatin on the development of acetic-acid-induced colitis, rats were treated twice intraperitoneally with saline (control) or obestatin (4, 8 or 16 nmol/kg/dose). The first dose of saline or obestatin was administered 8 h before the induction of colitis, the second 7 h after the first dose. Colitis was induced by a rectal enema of 1 ml of 4% solution of acetic acid. One or 24 h after the induction of colitis, the rats were anesthetized. After laparotomy, colonic mucosal blood flow and the area of colonic mucosa damage were measured. Biopsy samples of colonic mucosa were taken for histological and biochemical examination –as in the first stage of the study.

The third series of studies concerned the influence of obestatin administration on the course of acetic-acid-induced colitis. After a two-week recovery, colitis was induced by a rectal enema of 1 ml of 3.5% solution of acetic acid. Saline or obestatin (at the dose of 8 nmol/kg/dose) were administered intraperitoneally twice a day and the first dose of saline or obestatin was applied 24 h after rectal enema of acetic acid. Seven or 14 days after the induction of colitis, the rats were anesthetized and colonic mucosal blood flow, and the area of colonic mucosa damage were measured. Later biopsy samples of colonic mucosa were taken for biochemical examination.

**Results:** The first series of experiments showed that rectal administration of acetic acid induces colitis in all animals. Damage of the colonic wall was seen at the macroscopic and microscopic levels. This effect was accompanied by a reduction in colonic blood flow and mucosal DNA synthesis. Moreover, induction of colitis significantly increased mucosal concentration of pro-inflammatory interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), activity of myeloperoxidase and concentration of malondialdehyde (MDA). Mucosal activity of superoxide dismutase (SOD) was reduced. Pretreatment with ghrelin reduced the area and grade of mucosal damage. This effect was accompanied by an improvement in blood flow, DNA synthesis and SOD activity in the colonic mucosa. Moreover, ghrelin administration reduced mucosal concentration of IL-1 $\beta$  and MDA, as well as decreased mucosal activity of myeloperoxidase.

The second series of experiments showed, like the first stage of the study, that rectal administration of acetic acid induces colitis in all animals. Damage of colonic wall was seen at the macroscopic and microscopic levels. This effect was accompanied by a reduction in colonic blood flow and mucosal DNA synthesis. Moreover, induction of colitis significantly increased mucosal concentration of pro-inflammatory interleukin-1 $\beta$  and the activity of myeloperoxidase. Pretreatment with obestatin reduced the area and grade of mucosal damage. This effect was accompanied by an improvement in blood flow and DNA synthesis in the colonic mucosa. Moreover, obestatin administration reduced mucosal concentration of IL-1 $\beta$  and decreased mucosal the activity of myeloperoxidase.

The third series of experiments showed that the colonic mucosa underwent spontaneous repair after the induction of colitis with acetic acid. The area of mucosal damage was reduced by around 60%

between the 7th and 14th day after the application of acetic acid. Treatment with obestatin for 6 days accelerated the healing of the colonic mucosa, reducing damage of the colonic wall in a statistically significant way. It also caused the improvement in DNA synthesis and blood flow in the colonic mucosa. This effect was accompanied by a reduction in mucosal concentration of IL-1 $\beta$  and activity of myeloperoxidase. Treatment with obestatin for 13 days caused complete regeneration of the colonic mucosa. Moreover, normal mucosal blood flow and DNA synthesis were restored. Also mucosal concentration of IL-1 $\beta$  and mucosal activity of myeloperoxidase were markedly reduced.

**Conclusions:** (1) Ghrelin and obestatin exhibit a protective effect on the colon, protecting it against the development of acetic-acid-induced colitis. (2) Administration of obestatin accelerates the healing of acetic-acid-induced colitis. (3) These beneficial effects of peptides encoded by the ghrelin gene are related, at least in part, to the improvement of colonic blood flow and colonic cell vitality, as well as to a reduction in the release of pro-inflammatory interleukin-1 $\beta$  and also may be the result of inhibiting the formation of free radicals.

**Key words:** obestatin, ghrelin, acetic-acid-induced colitis, DNA synthesis, interleukin-1 $\beta$ .