

1. Imię i nazwisko:  
Kateryna Pierzynowska (z domu Goncharova)
  
2. Dyplomy, stopnie naukowe - z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu pracy doktorskiej:
  - a) doktorat z dziedziny Zootechniki (2016), Nauki rolnicze, Instytut Zootechniki Państwowego Instytut Badawczy, Balice, Polska. Tytuł pracy doktorskiej: **„Fizjologiczna rola zewnątrzwydzielniczej trzustki oraz budowa i funkcja mózgu w badaniach na modelu świni”**,
  - b) doktorat z zakresu fizjologii człowieka i zwierząt (2015), Nauki biologiczne, Instytut Fizjologii im. Bohomolca, Kijów, Ukraina. Tytuł pracy doktorskiej: **„Wpływ enzymów mikrobiologicznych podanych dojelitowo na zachowanie i regenerację neuronów obszaru hipokampalnego CA1”**.
  - c) Magister w dziedzinie Cytologii, Histologii i Biologii Rozwojowej (2011), Nauk biologicznych, Narodowy Uniwersytet im. Tarasa Szewczenki, Kijów, Ukraina. Temat pracy magisterskiej: **“Neuroprotektoryjne efekty pre- i postkondycjonowania przy modelowaniu niedokrwiennego uszkodzenia mózgu”** (dyplom z wyróżnieniem).
  - d) licencjat z biologii (2009), Państwowy Uniwersytet im. Tarasa Szewczenki, Kijów, Ukraina (dyplom z wyróżnieniem).

3. Informacje o poprzednim zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

2016 – obecnie, staż doktorski / pracownik naukowy w Katedrze Biologii,  
Lund University, Szwecja - członek grupy Gut.

2015 – obecnie, konsultant biomedyczny w Anara AB, Szwecja.

2015 – 2018, konsultant biomedyczny w Alcresta Ltd, USA.

2015 – 2016, doktorantka w Instytucie Zootechniki PIB, Balice, Polska.

2011 – 2014, asystent naukowy w Katedrze Cytologii Instytutu Fizjologii Bohomolca,  
Ukraińska Akademia Nauk, Kijów, Ukraina.

KP

4. Wskazanie osiągnięć \* wynikających z art. 16 sek. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. Poz 882 ze zm. W Dz. Z 2016 r. Poz. 1311.):

a) Tytuł serii publikacji związanych tematycznie:

**Ocena zależności funkcji zewnątrzwydzielniczej i wewnątrzwydzielniczej trzustki oraz jej rola w patofizjologii otyłości i cukrzycy typu 2 w badaniach na zwierzętach**

b) Lista prac naukowych objętych cyklem:

1. Pierzynowska K, Valverde-Piedra J, Szymanczyk S, Prykhod'ko O, Pieszka M, Kardas M, Grochowska-Niedworok E, Grabowski T, Winiarczyk M, Pierzynowski S. 2018. Pancreatic-like enzymes of microbial origin restore growth and normalize lipid absorption in a pig model with exocrine pancreatic insufficiency. Arch Med Sci. 14(2):407-414. IF=2.344, punkty MNiSW=30.
2. Pierzynowski SG, Goncharova K, Woliński J, Prykhodko O, Weström B and Lozinska L. 2016. Enteral pancreatic-like enzymes of microbial origin affect insulin release during an intravenous glucose tolerance test. J Diabetes Met; 7: 681. IF=0.000, punkty MNiSW=8.
3. Pierzynowski SG, Goncharova K, Gregory PC, Weström B, Podprietov SE, Podprietov SS, Woliński J, Repich H, Wierup N, Lozinska L. 2017. Experiments suggesting extra-digestive effects of enteral pancreatic amylase and its peptides on glucose homeostasis in a pig model. Sci Rep. Aug 17;7(1):8628. IF=4.122, punkty MNiSW=40.
4. Socha-Banasiak A, Pierzynowski S, Woliński J, Grujic D, Boryczka M, Grzesiak P, Szczurek P, Czkwianianc E, Westrom B, Goncharova K. 2017. The pig as a model for premature infants - the importance of immunoglobulin supplementation for growth and development. J Biol Regul Homeost Agents. Jan-Mar;31(1):87-92. IF=1.397, punkty MNiSW=20.

5. Pierzynowska K, Lozinska L, Woliński J, Pierzynowski S. 2018. The inverse relationship between blood amylase and insulin levels in pigs during development, bariatric surgery, and intravenous infusion of amylase. *PLoS One*. Jun 6;13(6):e0198672. IF=2.766, punkty MNiSW=35.
  6. Pierzynowski SG, Gregory PC, Filip R, Woliński J, Pierzynowska K. 2018. Glucose homeostasis dependency on acini-islet-acinar (AIA) axis communication: a new possible pathophysiological hypothesis regarding diabetes mellitus. *Nutrition and Diabetes*. Oct 8;8(1):55. IF=2.742, punkty MNiSW=30.
- c) omówienie naukowego celu wyżej wymienionych prac oraz uzyskanych wyników, wraz z omówieniem ich możliwego wykorzystania:

**Rozwiniecie skrótów i określeń w języku angielskim:**

- AIA – Acini-Islet-Acinar = PWP - pęcherzykowo-wysepkowo-pęcherzykowa,  
AL – alimentary loop (pętla pokarmowa),  
ARA – arachidonic acid (kwas arachidonowy),  
AUC – area under the curve (powierzchnia pod krzywą),  
BBB – brain-blood barrier (bariera mózg-krew),  
BMI – body mass index (wskaznik masy ciała),  
BL – biliary loop (pętla żółciowo-trzustkowa),  
CF – cystic fibrosis (mukowiscydoza),  
CKD – chronic kidney disease (przewlekła niewydolność nerek),  
CL – common loop (wspólna pętla jelitowa),  
CP – chronic pancreatitis (przewlekłe - chroniczne zapaleniem trzustki),  
CSF – cerebrospinal fluid (płyn mózgowo-rdzeniowy),  
DCX – doublecortin (doublekortina),  
DHA – docosohexaenic acid (kwas dokozaheksaenowy),  
DJB – duodenal – jejunal bypass (operacja bariatryczna – operacja pomostowa),  
EPA – eicosapentaenic acid (kwas eikozapentaenowy),  
EPI – exocrine pancreatic insufficiency (zewnątrzwydzielnicza niewydolność trzustki),

- GAP43 – growth associated protein 43 (białko związane z wzrostem 43),
- GFR – glomerular filtration rate (współczynnik filtracji kłębuszkowej),
- GIP – gastric inhibitory peptide (żołądkowy peptyd hamujący),
- GLUT1 – glucose transporter 1 (transporter glukozy 1),
- GLUT2 – glucose transporter 2 (transporter glukozy 2),
- GTT – glucose tolerance test (test tolerancji glukozy),
- HUA – hyperuricemia (hiperurykemia),
- Ig – immunoglobulin (immunoglobulina),
- IgG – immunoglobulin G (immunoglobulina G),
- Iv – dożylnie (intravenous),
- iML – immobilized microbial lipase (immobilizowana lipaza pochodzenia mikrobiologicznego)
- IVGTT – intravenous glucose tolerance test (dożylny test tolerancji glukozy),
- LCPUFA – long chain polyunsaturated fatty acids (wielonienasycone kwasy tłuszczowe),
- MAP2 – microtubule-associated protein 2 (białko związane z mikrotubulami 2),
- MAPK – mitogen activated protein kinase (aktywowana mitogenna kinaza białkowa),
- Neurog3 – neurogenine 3 (neurogenina 3),
- PLEM – pancreatic – like enzyme of microbial origin (enzymy pochodzenia bakteryjnego podobne do trzustkowych),
- PTF 1 – pancreatic-specific transcription factor 1 (specyficzny dla trzustki czynnik transkrypcyjny 1),
- SEM – standard error of mean (błąd standardowy średniej arytmetycznej, błąd standartowy),
- STAT 3 – signal transducer and activator of transcription 3 (sygnał transkrypcji 3),
- TP – total protein (białko całkowite),
- UA – uric acid (kwas moczowy),
- WHO – World Health Organization (Światowa Organizacja Zdrowia).

## Wstęp

Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization - WHO) liczba osób otyłych i chorych na cukrzycę typu 2 wzrosła na świecie ponad dwukrotnie w porównaniu do 1980 roku. W 2016 roku ponad 1,9 mld pełnoletnich osób miało nadwagę (39 % populacji), z czego 650 mln było otyłych (13 % populacji). W 2016 roku 41 miliony dzieci poniżej 5 roku życia miały nadwagę lub otyłość [1].

Otyłość przyczynia się do powstawania chorób naczyniowo-sercowych, chorób układu oddechowego, przewlekłych chorób nerek, układu mięśniowo-szkieletowego, zaburzeń przewodu pokarmowego, problemów psychicznych, a nawet raka. Spośród wszystkich problemów zdrowotnych najczęściej z otyłością wiąże się cukrzyca typu 2. Jest również najczęściej występującą postacią cukrzycy [2]. Cukrzyca jest pierwszą, niezakaźną chorobą uznaną przez ONZ za epidemię XXI wieku [3]. Według Światowej Organizacji Zdrowia do 2025 r. co piąta osoba na świecie będzie musiała zmagać się z cukrzycą. Pierwszy raport WHO Global na temat cukrzycy pokazuje, że liczba dorosłych chorych na cukrzycę wzrosła prawie czterokrotnie od 1980 r. do 422 milionów dorosłych. Ten dramatyczny wzrost jest w dużej mierze spowodowany wzrostem cukrzycy typu 2, a czynniki ją napędzające obejmują nadwagę/otyłość [4]. Z danych Światowej Federacji Cukrzycy wynika natomiast, że rocznie z powodu choroby umiera już 4, 0 mln osób. To piąta pod względem przyczyny zgonu choroba, na którą najczęściej umierają ludzie na świecie [2].

Okolo 87-91% przypadków cukrzycy to cukrzyca typu 2. Nadwaga i brak aktywności fizycznej wiążą się ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na cukrzycę typu 2 [5, 6]. Ponieważ nadwaga jest ważnym czynnikiem prognostycznym dla cukrzycy typu 2, termin "diabesity" został zaproponowany przez Astrup i Finer w 2000 roku [7].

Cukrzyca jest chorobą przewlekłą, dlatego chorzy muszą stale monitorować swój stan zdrowia i stosować odpowiednie leczenie. W związku z tym diabetycy precyzują swoje potrzeby dotyczące leków i metod terapii, biorąc pod uwagę rozwiązania, które nie będą znacząco wpływały na jakość życia, zapewnią wygodę i komfort stosowania oraz pozwolą na normalne funkcjonowanie. 59 % pacjentów na świecie, a w Polsce aż 75 % chorych na cukrzycę czuje obawę przed rozpoczęciem insulinoterapii. Głównym powodem takiego podejścia u diabetyków jest lęk przed samodzielną iniekcją insuliny oraz obawa przed niewłaściwym wykonaniem iniekcji [8]. Ponadto insulinoterapia

charakteryzuje się szeregiem zasad, których należy przestrzegać, m.in. wymiana igieł po podaniu zastrzyku, dobór długości igieł, zmiana miejsc wstrzyknięć insuliny, aby zapobiec powstawaniu przerostów tkanki, zrostów i zgrubień. Insulinoterapia jest stosowana w cukrzycy typu 1 oraz w przypadku, gdy podawanie doustnych przeciwcukrzycowych u chorych z cukrzycą typu 2 nie daje pożądaných efektów [9].

Drugą, zdecydowanie częściej stosowaną formą leczenia cukrzycy typu 2 są doustne leki przeciwcukrzycowe. Niektóre, – np. metformina, nie działają interwencyjnie, jej pełne działanie w postaci zmniejszenia glikemii pojawia się po około 2 tygodniach stosowania. Inne, skutecznie obniżają stężenie glukozy, ale mogą wywoływać niedocukrzenia (hipoglikemie). Do najczęściej spotykanych objawów ubocznych stosowania doustnych leków przeciwcukrzycowych należą nudności, brak apetytu i wymioty. Terapia wiąże się ze znalezieniem odpowiedniego zestawu leków dla każdego pacjenta indywidualnie [9, 10]. Warto dodać, że najbardziej skuteczne w opinii lekarzy leki inkretynowe, pobudzające wydzielanie insuliny tylko wtedy, gdy wzrasta poziom cukru we krwi, nie są refundowane, co zwiększa koszty leczenia. Zasadność przepisania leków pobudzających wydzielanie insuliny, przy jej nadprodukcji, nadal pozostaje kwestią kontrowersyjną.

W związku ze wzrostem zachorowalności na cukrzycę, złymi nawykami żywieniowymi oraz wzrostem świadomości społeczeństwa bardzo ważne jest ustalenie przyczynym epidemii cukrzycy typu 2.

Na podstawie przeprowadzonych badań własnych można wnioskować, że jedną z przyczyn tej epidemii może być brak zrozumienia zależności pomiędzy funkcją zewnątrzwydzielniczą a wewnątrzwydzielniczą trzustki. Prezentowane w niniejszej rozprawie badania podstawowe na zwierzętach nad komunikacją wewnątrzustkową doprowadziły do identyfikacji takiej molekuly – jest nią amylaza, która efektywnie reguluje homeostazę glukozy jednocześnie reguluje wydzielanie insuliny. Potwierdzenie tego w badaniach klinicznych byłoby kamieniem milowym dla zdrowia publicznego i profilaktyce tej choroby cywilizacyjnej.

Powszechnie wiadomo, że trzustka jest gruczołem dokrewnym (wydziela hormony – funkcja wewnątrzwydzielnicza): insulinę, glukagon, somatostatynę oraz gruczołem trawiennym (wydziela enzymy trawienne do dwunastnicy – funkcja zewnątrzwydzielnicza): amylazę, tripsynę, chymotrypsynę, karboksypeptydazę, lipazę, nukleazy. Komórki trzustki odpowiedzialne za obie funkcje różnią się lokalizacją.

Współistnienie obydwu funkcji od lat jest przedmiotem badań nad zależnością pomiędzy nimi. Z fizjologicznego i klinicznego punktu widzenia, badanie tych dwóch funkcji a zarazem miejsca oddzielnie jest dużo łatwiejsze. Toteż zewnątrzwydzielnicza funkcja była zawsze postrzegana jako domena gastroenterologii, podczas gdy wewnątrzwydzielnicza była obszarem zainteresowania diabetologów.

Większość masy trzustki odpowiada za funkcję zewnątrzwydzielniczą, podczas gdy komórki endokrynne są "zawarte" w dobrze zdefiniowanych, zamkniętych wysepkach Langerhansa. Część trzustki odpowiadająca za funkcję wewnątrzwydzielniczą jest filogenetycznie starsza niż ta zewnątrzwydzielnicza. Można zatem wnioskować, że komórki  $\beta$  są prekursorami filogenetycznymi trzustki ssaków, i że część odpowiadająca za wydzielanie zewnętrzne mogła powstać w wyniku działania specyficznego dla trzustki czynnika transkrypcyjnego 1 (pancreatic-specific transcription factor 1 – PTF 1). PTF 1 jest czynnikiem, który reguluje ekspresję genów specyficznych dla zewnątrzwydzielniczych komórek w wewnątrzwydzielniczych komórkach trzustki. Poprzednie badania na modelach zwierzęcych wykazały, że obniżenie poziomu PTF 1 w zewnątrzwydzielniczych komórkach trzustki może prowadzić do ich transformacji do komórek wewnątrzwydzielniczych. Powyższy przykład potwierdza, że możliwa jest sygnalizacja między komórkami trzustki przez płyn zewnątrzkomórkowy, a także, co ma również znaczenie, że produkty końcowe zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzwydzielniczych części narządu mogą oddziaływać lokalnie. Po drugie, wyżej wspomniana koncepcja została rozwinięta w badaniach z udziałem ludzi, co pozwoliło autorom na stwierdzenie, że komórki zewnątrzwydzielnicze z ekstrahowanej ludzkiej trzustki można przeprogramować na transplantowalne komórki produkujące insulinę, które mogą być w pełni metabolicznie aktywne. Podstawowy mechanizm opiera się na fakcie, że uruchomienie aktywowanej mitogenem kinazy białkowej (mitogen activated protein kinase – MAPK) i przetwornika sygnału oraz aktywatora transkrypcji 3 (signal transducer and activator of transcription 3 – STAT 3) może przekształcić je w komórki podobne do komórek  $\beta$  [11]. Ponadto ektopowa sygnalizacja przez MAPK i STAT3 może również przekształcać ludzkie komórki pęcherzykowe w komórki podobne do  $\beta$ -komórek. Inne badania potwierdziły tę hipotezę i potwierdziły, że ektopowa ekspresja aktywowanego MAPK i STAT3 w ludzkich pęcherzykowych komórkach trzustki może aktywować pro-wewnątrzwydzielniczy czynnik transkrypcyjny neurogeninę 3 (neurogenine 3 – Neurog3), powodując przeprogramowanie ludzkich komórek pęcherzykowych na  $\beta$ -podobne komórki, które są w stanie niwelować cukrzycę [12]. Jest to zatem dowód, że istnieją złożone zależności między produktami zewnątrzwydzielniczymi a wewnątrzwydzielniczymi trzustki.

Przedstawiono dowody, że insulina i inne czynniki pochodzące z wysepek trzustkowych regulują bezpośrednio, a nawet mogą być niezbędne dla prawidłowej czynności komórek pęcherzykowych [13-20]. Udowodniono to przede wszystkim w przypadku wytwarzania amylazy (tzw. "zjawisko halo") [21-23]. Z drugiej strony, hiperstymulacja trzustkowych komórek pęcherzykowych podczas długotrwałej hiperinsulinemii i ewentualnie nadprodukcji innych hormonów wysp, które wchodzi w kontakt z komórkami pęcherzykowatymi (produkującymi enzymy) poprzez płyn inerstycjalny [24], może osłabić produkcję enzymów trzustkowych. Wykazano występowanie związku pomiędzy zewnątrzwydzielniczą niewydolnością trzustki (exocrine pancreatic insufficiency - EPI), a utratą funkcji komórek beta: cukrzycę obserwowano u 70% pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki (chronic pancreatitis - CP) i u 91% pacjentów z przewlekłym zwapniającym zapaleniem trzustki, podczas gdy u 16% pacjentów obserwowano również hipoglikemię [25]. Wystąpienie cukrzycy u pacjentów z CP może przynajmniej częściowo wynikać z unieczynnienia komórek  $\beta$ , być może z powodu utraty czynników troficznych z pęcherzyków, a także zdolności reagowania na glukozę [26]. Pacjenci z EPI jako powikłaniem mukowiscydozy (cystic fibrosis - CF) również wykazują zmniejszoną zdolność wydzielniczą komórek  $\beta$  w porównaniu z pacjentami cierpiącymi na mukowiscydozę, ale głównie dotyczącą powikłań płucnych a nie trzustkowych. W tym przypadku istnieją dowody na zaburzenia w przetwarzaniu proinsuliny [27]. Cukrzyca wtórna do CP jest również związana ze zwiększonym wydzielaniem somatostatyny indukowanym posiłkiem w porównaniu z pacjentami z cukrzycą typu 1 lub grupą kontrolną [28]. U pacjentów z CP glukoza podawana doustnie indukuje wzrost stężenia glukagonu, zamiast jego zmniejszenie w grupie kontrolnej, jak również wzrost żołądkowego peptydu hamującego (gastric inhibitory peptide - GIP) [29].

Około 100 lat temu naukowcy odkryli obecność enzymów trzustkowych, takich jak amylaza trzustkowa, lipaza, elastaza [30-32]. Stwierdzono, że poziom amylazy trzustkowej w surowicy jest związany z różnymi zmianami fizjologicznymi, takimi jak: upośledzenie funkcji wątroby, a nie tylko jest charakterystyczny dla zewnątrzwydzielniczej funkcji trzustki [31, 33]. Sprzeczne dane dotyczące czynników wpływających na poziom amylazy we krwi dodatkowo komplikują interpretację przeprowadzonych i aktualnie prowadzonych badań. W badaniach przeprowadzonych we wczesnych latach 30-tych XX wieku usunięcie trzustki i gruczołów ślinowych w modelu szczurzym nie spowodowało znaczącego zmniejszenia stężenia amylazy we



krwi [34]. W 1958 r. Adam Dreiling zasugerował, że mechanizm regulujący poziom amylazy we krwi może mieć charakter pozatrzustkowy np. wątrobowy [31, 35].

Aktywność amylazy w surowicy okazała się wysoce zmienna we wczesnym okresie postnatalnym u noworodków u ludzi - zwykle poziom ten oscyluje w dolnej granicy normy ustalonej dla dorosłych [36]. Ostatnie badania wykazały, że wyższe poziomy amylazy we krwi były dodatnio skorelowane z wyższą wrażliwością na insulinę, podczas gdy niższa aktywność amylazy w osoczu była skorelowana u pacjentów z otyłością i zaburzeniami metabolicznymi [37-39]. Wskazuje to na potencjalny wpływ poziomu amylazy we krwi na funkcjonowanie hormonów trzustkowych. Wchłanianie enzymów trzustkowych z jelita w warunkach fizjologicznych jest znikome i u osób zdrowych w ogóle nie powinno mieć miejsca [40]. Ponadto obecność immunoreaktywnego trypsynogenu, jak również aktywność amylolityczna i lipolityczna we krwi, sugerują, że ich poziomy w osoczu są wynikiem "wycieku" enzymów trzustkowych z trzustki do krwioobiegu, a nie ponownego wchłaniania wydzielanych enzymów [41, 42]. Stężenie enzymów trzustkowych zatem w płynie śródmiąższowym otaczającym pęcherzyki trzustkowe i pobliskie wysepki trzustki byłoby wielokrotnie większe niż w krwi obwodowej. Bezpośrednie badanie wpływu funkcji zewnątrzwydzielniczej trzustki na funkcję wewnątrzwydzielniczą jest złożone i wymaga zastosowania specyficznych modeli eksperymentalnych.

Ze względu na podobieństwa w morfologii i fizjologii układu żołądkowo-jelitowego, czynniki enzymatyczne i hormonalne, czasy trawienia po posiłku i sprawność trawienną, świnię mogą służyć jako odpowiedni model dla człowieka [43, 44] do badania związku między zewnątrzwydzielniczą wewnątrzwydzielniczą funkcją trzustki.

## Cel pracy

Celem głównym pracy była **ocena zależności pomiędzy funkcją zewnątrzwydzielniczą a wewnątrzwydzielniczą trzustki oraz komunikacji wewnątrzsotkowej (pęcherzykowo-wysepkowo-pęcherzykowej - PWP (Acini-Islet-Acinar - AIA)), oraz jej roli w patofizjologii otyłości i cukrzycy typu II.**

Aby zrealizować cel główny przyjęto następujące cele szczegółowe:

- ustalenie czy terapia zastępcza enzymami trzustkowymi poprawia stan odżywienia i zdrowia w zewnątrzwydzielniczej niewydolności trzustki,

- określenie udziału enzymów trzustkowych – pochodzenia mikrobiologicznego w metabolizmie glukozy podczas dożylnego testu tolerancji glukozy,
- określenie udziału enzymów trzustkowych w kontroli glikemii i odpowiedzi insulinowej u świń grupy kontrolnej oraz po zabiegach bariatrycznych,
- stworzenie odpowiedniego modelu świni, mającego zastosowanie w badaniach metabolizmu lipidów i glukozy, odtwarzającego warunki panujące w organizmach noworodków ludzkich urodzonych o czasie i wcześniaków,
- zbadanie zależności między poziomem amylazy w osoczu a poziomem insuliny u świń rosnących,
- podsumowanie uzyskanych wyników i przedstawienie koncepcji wzajemnych regulacji wewnątrz- zewnątrzwydzielniczej funkcji trzustki:
  - a) acini-islet-acinar (AIA) - sprzężenia zwrotnego wewnątrztrzustkowego,
  - b) odmiennej regulacji poziomu glukozy przez insulinę w porównaniu do regulacji glukozy przez amylazę w nabłonku jelitowym.

## **Materiały i metody**

Aby osiągnąć wyżej wymienione cele, wykorzystano kilka modeli świni domowej odzwierciedlających różne stany zdrowia ludzi. Wszystkie badania na zwierzętach przeprowadzono zgodnie z zaleceniami zawartymi w „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health”. Protokoły zostały zatwierdzone przez lokalne komitety etyczne.

*Badanie pierwsze (opisane w **Artykule 1**)* przeprowadzono na świńskim modelu chirurgicznie indukowanej (śródooperacyjne podwiązanie przewodu trzustkowego) zewnątrzwydzielniczej niewydolności trzustki (EPI). Doświadczenia przeprowadzono na 12 kastrowanych samcach z rozwiniętą w ciągu 1 miesiąca od operacji EPI, a 10 zdrowych świń stanowiło grupę kontrolną. W celu pobierania krwi u wszystkich zwierząt zaimplanowano katetery do żyły szyjnej. Zwierzęta umieszczono w indywidualnych klatkach kolekcyjnych w celu kolekcji kału i moczu oraz dokładnego monitorowania karmienia. Podczas badań świni były karmione dietą wysokotłuszczową, mimikującą składem dietę ludzką. Mieszanekę enzymów pochodzenia bakteryjnego (pancreatic-like enzymes of microbial origin - PLEM) podawano świniom dwa razy dziennie w czasie posiłku. We wszystkich próbach została zbadana ilość tłuszczu i białka przy użyciu

standardowych metod grawimetrycznych i Kjeldahla w laboratorium Eurofins (Lidköping, Szwecja). Profile lipidów we krwi analizowano pod kątem wskaźnika lipidowego i niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych, stosując odpowiednio procedurę turbidymetryczną i zestaw kolorymetryczny (Wako Chemicals GmbH, Niemcy). Poziom triglicerydów w osoczu i cholesterolu całkowitego zmierzono w laboratorium Medilab (Tarnaby, Szwecja).

*Badanie drugie (opisane w Artykule 2)* przeprowadzono na 5 zdrowych świnia. W celu pobierania krwi oraz wlewów glukozy wszystkim zwierzętom zaimplantowano katetery do żyły szyjnej, Roztwory enzymów podawano doustnie 1 godzinę przed dożylnym wlewem glukozy za pomocą strzykawki w ciągu 2 minut, po czym świnie otrzymały kolejne 40 ml wody do wypłukania jamy ustnej i gardła. Jako roztwór kontrolny podano 30 ml słodzonej wody. Próbkę krwi pobierano w 1 minutę przed (punkt czasowy 0) oraz w 5, 15, 30, 45, 60 i 120 minut po infuzji glukozy. Glukoza była mierzona w próbkach świeżej krwi za pomocą glukometru Accu-Chek® Aviva (Roche Diagnostics, Mannheim, Niemcy). Poziomy insuliny i peptydu C w osoczu mierzono odpowiednio za pomocą zestawu ELISA do oznaczania świńskich insuliny lub peptydu C (Mercodia, Uppsala, Szwecja).

*Trzecie badanie (opisane w Artykule 3)* przeprowadzono na 6 zdrowych i 12 świnia poddanych operacji bariatrycznej (DJB) (Ryc, 1, A-D). Wszystkim zwierzętom założono katetery do żyły szyjnej. U sześciu zdrowych świń wykonano łącznie 6 testów tolerancji glukozy (glucose tolerance test - GTT), 1) dożylny GTT, 2) doustny GTT, 3) posiłkowy GTT, 4) dożylny GTT po podaniu Creon®, 5) doustny GTT po podaniu Creon®, 6) posiłkowy GTT po podaniu Creonu®. Cztery świnie po operacji DJB otrzymały wlew glukozy do pętli żółciowo-trzustkowej (BL). Odpowiedź była porównywana z tą obserwowaną po doustnym 1 g glukozy / 1 kg bwt (OG). W kolejnych eksperymentach 5 świń po operacji DJB zostało poddanych czterem testom na tolerancję glukozy. Glukozę (1 g glukozy / kg bwt) podawano co drugi dzień do różnych pętli jelitowych, żółciowo-trzustkowej (BL), wspólnej (CL) lub pokarmowej (AL), a na końcu doustnie. Trzy świnie, które przeszły operację DJB, były poddawane GTT co drugi dzień, gdzie glukoza była podawana do BL samodzielnie lub razem z amylazą świńską lub peptydami pochodnymi z amylazy. Świńską amylazę trzustkową lub peptydy amylazy podawano na 1 godzinę przed GTT, a dodatkowo podawano je podczas GTT przez kaniule do pętli żółciowo-trzustkowej. Poziomy insuliny i peptydu C w osoczu mierzono odpowiednio za pomocą zestawu ELISA do oznaczania świńskiej insuliny lub peptydu C (Mercodia, Uppsala, Szwecja).

*Badanie czwarte (opisane w Artykule 4)* przeprowadzono na 39 prosiętach. Piętnaście wcześniaków urodzonych przez cesarskie cięcie (7 dni przed terminem urodzenia w 115 dniu ciąży) uzyskano od 2 macior. Wcześniaki te odpowiadały ludzkim noworodkom w około 32 tygodniu ciąży. Dwadzieścia cztery prosięta niessące z 6 miotów urodzonych naturalnie zostały odizolowane od loch i losowo podzielone na 4 grupy eksperymentalne. Po przeniesieniu prosiąt do laboratorium wszystkim prosiętom wprowadzono katetery do żyły pępowinowej w celu infuzji immunoglobulin lub podania surowicy świńskiej, jak również do pierwszego pobrania krwi (0h). U prosiąt wcześniaków, po 48 godzinach, ze względu na rosnącą aktywność uniemożliwiającą karmienie sądą, wszczepiono w trakcie zabiegu chirurgicznego specjalnie zaprojektowane katetery żołądkowe. Wszystkie prosięta karmiono odpowiednią dietą co 2 godziny. Całkowite stężenie białka (mg / ml) w próbkach osocza, surowicy świń i siarze oszacowano metodą Lowry'ego. Poziom immunoglobuliny G (IgG) (mg / ml) w próbkach osocza, surowicy świń analizowano za pomocą immunodyfuzji.

*Badanie piąte (opisane w Artykule 5)* przeprowadzono na: i) 18 wcześniakach prosiąt urodzonych przez cesarskie cięcie; ii) 4 prosiętach ssących; iii) 3 świniach po operacjach bariatrycznych (DJB) i 3 zwierzętach "scham - operated" , które były monitorowane do 3 miesiąca życia; iv) prosiętach odsadzonych w wieku 4 tygodni i monitorowanych do 3 miesiące, Zwierzęta z grupy (iv) użyto do zbadania wpływu dożylnego wlewu amylazy trzustkowej na poziom insuliny. Świnska alfa-amylazę trzustkową (5 000 U / świnię) rozpuszczoną w sterylnym 0,9% NaCl, podawano dwukrotnie przez kateter do żyły szyjnej, 1h, a następnie 1 minutę przed wykonaniem IVGTT. Każda świnka dwukrotnie przeszła IVGTT, z lub bez (kontrola ujemna) dożylnego wlewu amylazy, zgodnie z zasadami kwadratu łacińskiego umożliwiającego poprawną analizę statystyczną wyników. Próbki krwi pobrane od wcześniaków i nowo narodzonych prosiąt pobrano z żyły pępowinowej, około 1 godziny po cięciu cesarskim lub naturalnym porodzie. We wszystkich innych przypadkach pobierano krew z kateteru wprowadzonego do żyły szyjnej wewnętrznej. Stężenie insuliny i peptydu C w osoczu mierzono za pomocą specyficznego zestawu ELISA(Mercodia, Uppsala, Szwecja). Aktywność amylolityczną osocza analizowano przy użyciu etylideno-pNP-G7 (4,6-etylidenop-nitrofenylo-alfa, D-maltoheptaoyd) jako substratu, zgodnie z instrukcjami producenta (Infinity Amylase Liquid Stable Reagent; Thermo Fisher Scientific, Middletown, Virginia, USA), z modyfikacjami dla czytnika płytek mikrotitracyjnych.

Analizę statystyczną we wszystkich badaniach przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Prism, wersja 6 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA), Statistica, wersja 7 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) i R (w. 3.0.1).

### **Publikacja 1**

W publikacji (1), która inicjuje przedstawiony cykl publikacji, wykazano, że enzymy trzustkowe pochodzenia bakteryjnego (pancreatic-like enzymes of microbial origin – PLEM) podawane świnom EPI (model z niewydolnością trzustki) wpływały pozytywnie na proces trawienia tłuszczów i białek, a także przywrócenie zahamowanego wzrostu. Obserwacje behawioralne zwierząt wykazały, że świnie otrzymujące enzymy stały się bardziej żwawe, ruchliwe i interaktywne, co sugeruje poprawę ogólnego stanu zdrowia.

Terapia enzymatyczna zmniejszyła steatorrheę, masę stolca, a także znacznie podniosła współczynnik wchłaniania tłuszczu w porównaniu do świń zdrowych. Leczenie PLEM skutkowało zwiększoną absorpcją tłuszczu i białka oraz znormalizowanym współczynnikiem konwersji paszy. Zmiany te doprowadziły do odwrócenia zaburzeń wzrostu pomimo współczynnika wchłaniania azotu o 10% poniżej wartości obserwowanych u świń grupy kontrolnej.

Wyniki tego wstępnego eksperymentu wykazały, że funkcja jelita cienkiego bezpośrednio zależy od suplementacji enzymami podobnym do trzustkowych, co ułatwia prawidłowe trawienie, wchłanianie i wykorzystanie składników odżywczych. Ponadto PLEM może pośrednio powodować uwalnianie hormonów lub innych peptydów jelitowych regulujących funkcje śluzówki jelita cienkiego.

### **Publikacja 2**

Po uzyskaniu tak wyników dotyczących wzrostu i dobrego samopoczucia prosiąt EPI po podawaniu PLEM postanowiono połączyć te badania z wcześniej przeprowadzonymi, ale niepublikowanymi badaniami, nad udziałem PLEM w wewnątrzwydzielniczej funkcji trzustki. Utylizację glukozy oceniano podczas dożylnego testu obciążenia glukozą (intravenous glucose tolerance test – IVGTT) u młodych zdrowych świń grupy kontrolnej otrzymujących doustnie PLEM (publikacja 2).

W tym badaniu określono udział doustnego podawania enzymów trawiennych zwykle występujących w soku trzustkowym (proteinyazy, amylaza i lipazy) pochodzenia mikrobiologicznego, na poziom glukozy we krwi i insuliny w osoczu podczas IVGTT, w celu potwierdzenia ich znaczenia w zachowaniu prawidłowej glikemii u zwierząt.

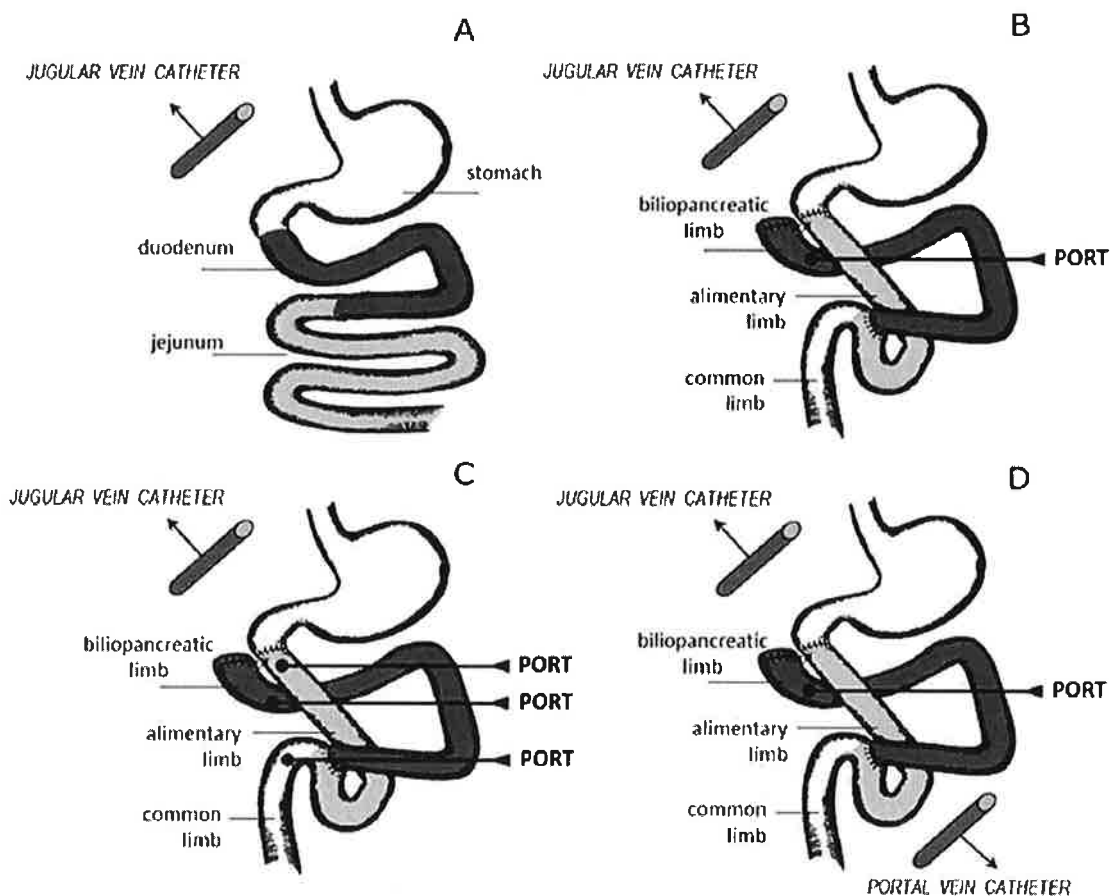
Wykazano, że podawana  $\alpha$ -amylaza powoduje wzrost wrażliwość na insulinę, zmniejszenie uwalniania insuliny, obniżenie oporności na insulinę (co może być wskazówką dla otyłości, cukrzycy typu 2 i zespołu metabolicznego). Uzyskane wyniki mogą sugerować, że suplementacja żywności amylazą ułatwia / pobudza wychwyt glukozy do enterocytów z krwi i jelita. Wskaźnik wrażliwości na insulinę S2, który, jak zaproponowano, jest istotny dla świń jako dokładny reprezentatywny wskaźnik wrażliwości na insulinę w oparciu o IVGTT [45] był najwyższy po podaniu amylazy. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić/przypuszczać, że  $\alpha$ -amylaza trzustkowa, poprzez interakcję z komórkami nabłonka, zwiększa „spożycie” glukozy przez enterocyty z krwi poprzez transportery glukozy 2 (glucose transporter 2 – GLUT2) niezależne od insuliny na ich stronie boczno-podstawowej. Inne mechanizmy działania  $\alpha$ -amylazy nie są wykluczone, np. poprzez peptydy pojawiające się po trawieniu  $\alpha$ -amylazy przez trypsynę lub inne proteinyazy. Zjawisko regulacji poziomu glukozy we krwi przez amylazę ma prawdopodobnie znaczenie we wczesnych stadiach rozwoju u noworodków, które wytwarzają dość dużą ilość amylazy trzustkowej, ponieważ są karmione wyłącznie mlekiem matki. Rola amylazy trzustkowej w świetle jelita podczas okresu ssania jest niejasna, ponieważ nie ma substratu w mleku dla  $\alpha$ -amylazy, która działałaby w tym czasie [46].

Biorąc pod uwagę powyższe, należy stwierdzić, że regulacja homeostazy glukozy jest głównym zadaniem  $\alpha$ -amylazy trzustkowej u noworodków, biorąc pod uwagę dobrze znany fakt, że poziomy insuliny w osoczu u nowonarodzonych świń są zasadniczo niskie [46]. Uzyskane wyniki sugerują insulinopodobne działanie anaboliczne amylazy na utylizację glukozy, które zachodzi za pośrednictwem niezidentyfikowanego mechanizmu w odpowiedzi na obecność  $\alpha$ -amylazy w świetle jelita. Mikrobiologiczna proteinyaza w przeciwieństwie do amylazy osłabia wrażliwość na insulinę zwiększając jej uwalnianie, podczas gdy lipaza nie ma znaczącego wpływu na wydzielanie insuliny.

Tak więc można stwierdzić, że  $\alpha$ -amylaza to bardzo ważny składnik soku trzustkowego, który działając z jelit i krwi reguluje wykorzystanie glukozy we krwi w sposób niezależny od insuliny, i w ten sposób opóźnia rozwój nietolerancji glukozy. Uzyskane dane wskazały na potrzebę dalszych badań określających rolę amylazy i proteinyaz w po posiłkowej homeostazie glukozy.

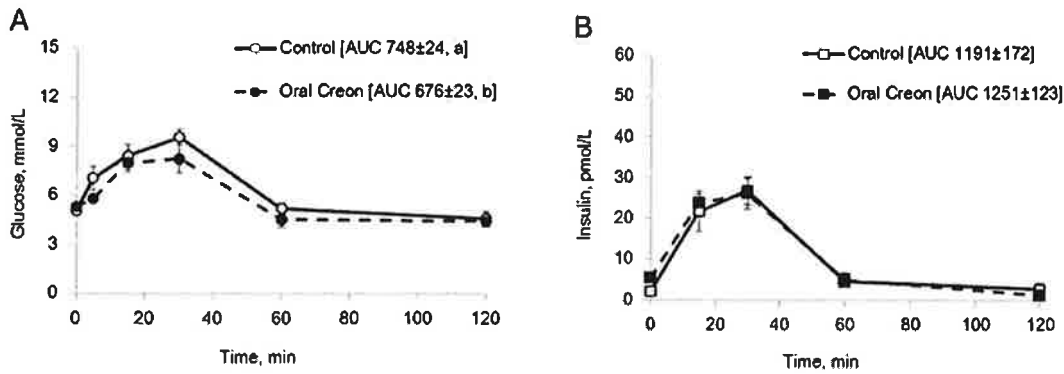
## Publikacja 3

Ponieważ stwierdzono, że dojelitowe podawanie amylazy wywiera bezpośredni wpływ na utylizację glukozy u świń (publikacja (2)), postanowiono określić wpływ specyficznych dla gatunku enzymów trzustkowych na kontrolę glikemii i odpowiedź insulinową u świń grupy kontrolnej i świń po zabiegach bariatrycznych (publikacja (3)). Model świni „bariatrycznej” (ryc. 1) został wybrany ze względu na pozytywny wpływ chirurgii bariatrycznej na poprawę glikemii po posiłkowej. Wyeliminowanie cukrzycy typu 2 u otyłych pacjentów jest dobrze znane, a efekty te sugerują, że istnieje nieznan mechanizm kierujący wydzielaniem wysepek trzustkowych [47].

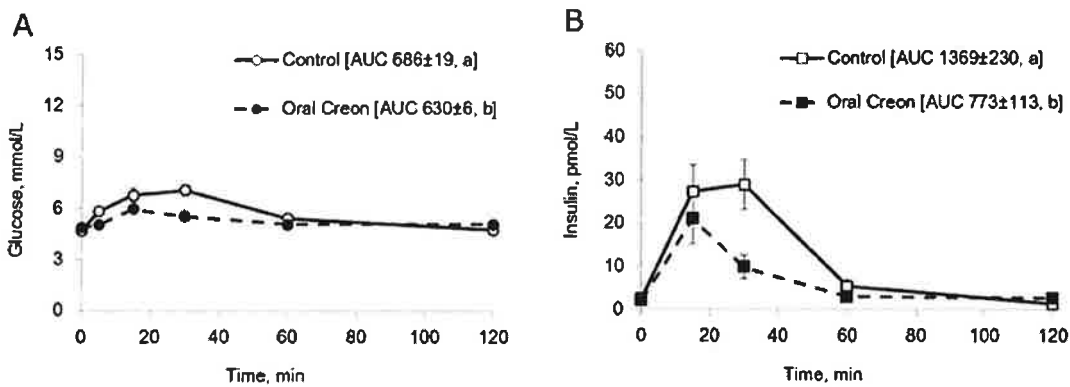


Ryc. 1. (A-D) Schematy ilustrujące położenie zaimplantowanych kateterów krwi (jugular and portal vein catheter) i przetok jelitowych (port) u zdrowych świń (A) oraz u świń po operacji transpozycji dwunastnicy i jelita czczego (pomost dwunastniczo-czczy; (duodenal-jejunal bypass - DJB), (B, C, D) pętla żółciowo-trzustkowa (BL), pętla pokarmowa (AL) i wspólna pętla jelitowa (CL) (publ. 3).

Głównym wynikiem przedstawionego doświadczenia jest fakt, że doustne podanie enzymów trzustkowych (Creon®) obniżyło poziomy glukozy w osoczu i zredukowało dostępność biologiczną glukozy (area under the curve – AUC) po doustnym obciążeniu glukozą (Ryc. 2A), jak również jak po posiłku testowym (ryc. 3A).



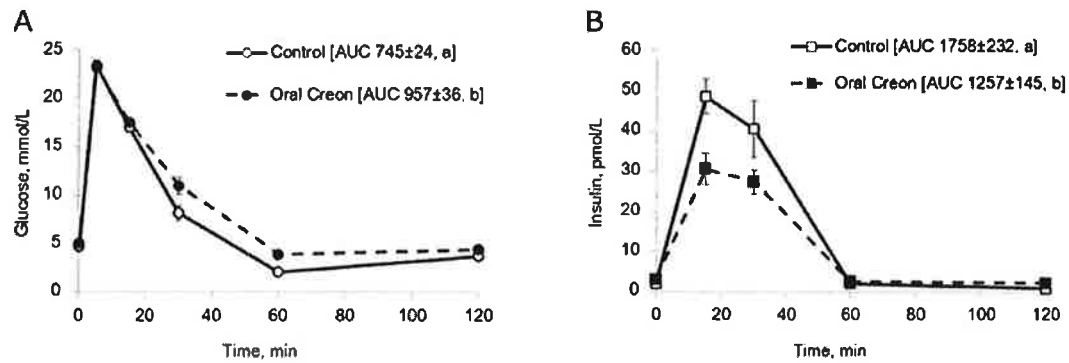
Ryc. 2. (A, B) Stężenie glukozy we krwi (A) i insuliny w osoczu (B) podczas enteralnego testu tolerancyjnego dla glukozy GTT bez podania enzymów (kontrola) i 1 godz. po podaniu doustnym enzymów (Creon®) u świń grupy kontrolnej. Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  SEM (n = 6) z wartościami powierzchni pod krzywą (AUC) przedstawionymi w nawiasach. Różne litery podane z wynikami na poszczególnych rycinach wskazują różnice statystycznie istotne (p < 0,05) pomiędzy grupami (publ. 3).



Ryc. 3. (A, B) Stężenie glukozy we krwi (A) i insuliny w osoczu (B) podczas posiłkowego testu tolerancyjnego na glukozę - GTT w kontroli i 1 godzinę po podaniu doustnym enzymów (Creon®) u świń grupy kontrolnej. Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  SEM (n = 6) z wartościami AUC przedstawionymi w nawiasach. Różne litery podane z wynikami wskazują różnice statystycznie istotne (p < 0,05) między grupami (publ. 3).

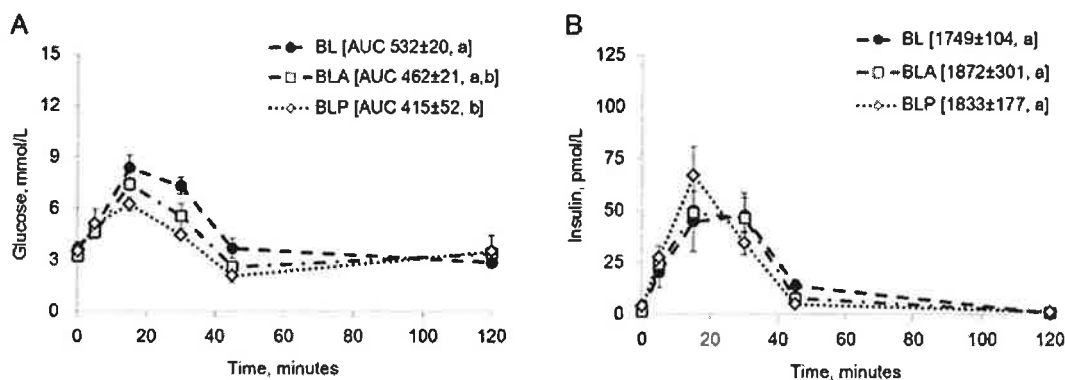
Przeciwnie, wolniejsze wydalenie i zwiększona wartość AUC dla glukozy obserwowano po enteralnym podaniu Creonu® przed dożylnym testem tolerancji glukozy (Ryc. 4A). Wyniki sugerują, że enzymy trzustkowe, podawane doustnie, zmniejszają wchłanianie glukozy w jelitach do krwi i zmniejszają szybkość eliminacji glukozy we krwi u świń grupy kontrolnej ze względu na zmniejszone uwalnianie insuliny (Ryc. 4B).





Ryc. 4. (A, B) Stężenie glukozy we krwi (A) i stężenia insuliny w osoczu (B) podczas dożylnego testu tolerancji glukozy (IVGTT) w dośw. kontrolnym i w 1 godzinę po doustnym podaniu enzymów (Creon®) u zdrowych świń. Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ) z wartością powierzchni pod krzywą (AUC) przedstawioną w nawiasach. Różne litery wskazują różnice statystycznie istotne ( $p < 0,05$ ) między grupami (publ. 3).

Ponadto uzyskane wyniki sugerują, że amylaza jest kluczowym enzymem odpowiedzialnym za te efekty, ponieważ wchłanianie glukozy zmniejszyło się, gdy amylaza trzustkowa lub peptydy amylazy podano do jelitowej pętli żółciowo-trzustkowej (BL) u świń modelowych z doustnym bypasem (duodeno-jejunal bypass - DJB) (ryc. 5A).

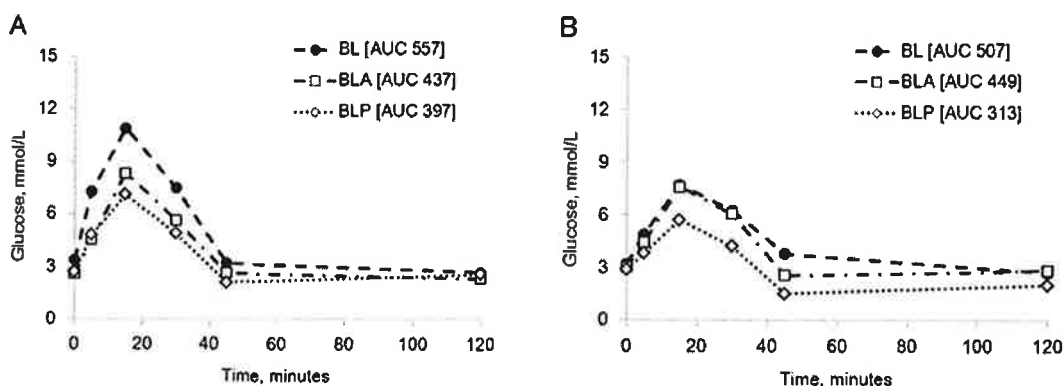


Ryc. 5. (A, B) Poziomy glukozy we krwi (A) i insuliny w osoczu (B) (w próbkach żyły szyjnej) podczas GTT – infuzja glukozy do pętli żółciowo-trzustkowej (BL) lub po infuzji glukozy razem z amylazą (BLA) lub po infuzji glukozy z peptydami pochodzącymi z trawienia amylazy (BLP) u świń DJB. Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ) z wartościami AUC przedstawionymi w nawiasach. Różne litery podane z wynikami wskazują na statystycznie istotne różnice ( $p < 0,05$ ) między wlewem glukozy bez amylazy (BL) i dodatkiem amylazy (BLA) lub peptydu amylazy (publ.3).

Wyniki badania potwierdziło, że amylaza może być ważnym czynnikiem regulującym metabolizm glukozy, a w konsekwencji wydzielanie insuliny (ryc. 4B i 5B), a zatem może mieć wpływ na rozwój otyłości i cukrzycy typu 2. Wcześniej opisano, że wysoka aktywność amylazy ślinowej we krwi jest związana z poprawą glikemii [37].

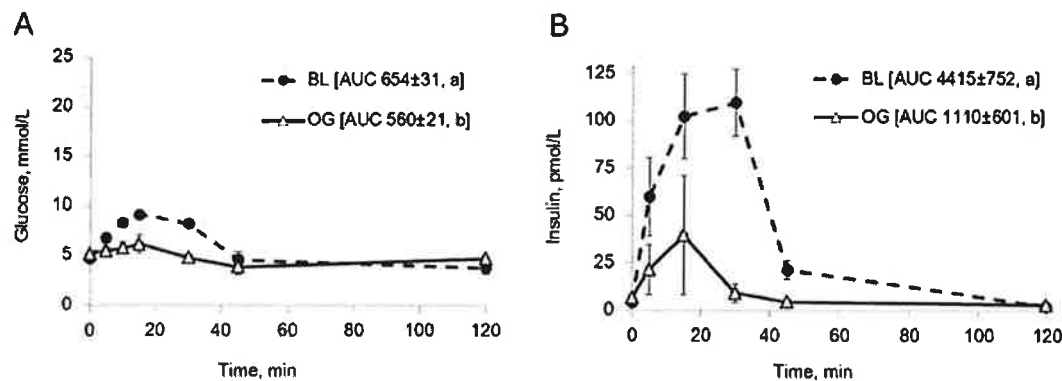
I odwrotnie, że niski poziom amylazy w surowicy jest związany z rozwojem cukrzycy [48] oraz ze zwiększonym ryzykiem rozwoju syndromu metabolicznego [49]. Ponadto, wykazano związek między niskim poziomem amylazy w surowicy i zmniejszonym poziomem insuliny w osoczu [50]. Ostatnio stwierdzono pozytywny związek pomiędzy niską zawartością amylazy w surowicy i otłuszczeniem brzuszynym u osób starszych [49]. Niewielka liczba kopii genu amylazy ślinowej jest związana z otyłością [38, 51], podczas gdy duża liczba kopii amylazy w genomie jest czynnikiem antyotyłościowym [39]. Wnioski z badania własnego mogą stanowić potencjalne wyjaśnienie wyników tych badań, ponieważ osoby z nadprodukcją amylazy regulują wchłanianie glukozy w sposób niezależny od insuliny, co w szerszym znaczeniu wpływa na metabolizm lipidów (otyłość), zapobiega oporności na insulinę i zmniejsza stan zapalny [38].

Wyniki autorskich badań mogą sugerować alternatywny, nieopisany dotąd, mechanizm dodatkowych działań amylazy. Produkty trawienia amylazy i/lub amylaza mogą służyć jako sygnał wzmacniający metabolizm glukozy w jelitach [52, 53], obniżając tym samym całkowitą absorpcję glukozy (ryc. 5A). Jeśli mniej glukozy zostanie przeniesione do układu krążenia, glukoza prawdopodobnie będzie częściowo metabolizowana w enterocytach po przejściu przez błonę enterocyty. Różnica w poziomach glukozy spowodowana obecnością amylazy i jej peptydów w pętli żółciowo-trzustkowej (BL) we krwi trzewiowej pobranej z żyły wrotnej, a także próbki pobranej z żyły szyjnej (obwodowej) świni DJB potwierdza tę hipotezę (Ryc. 6A, B).

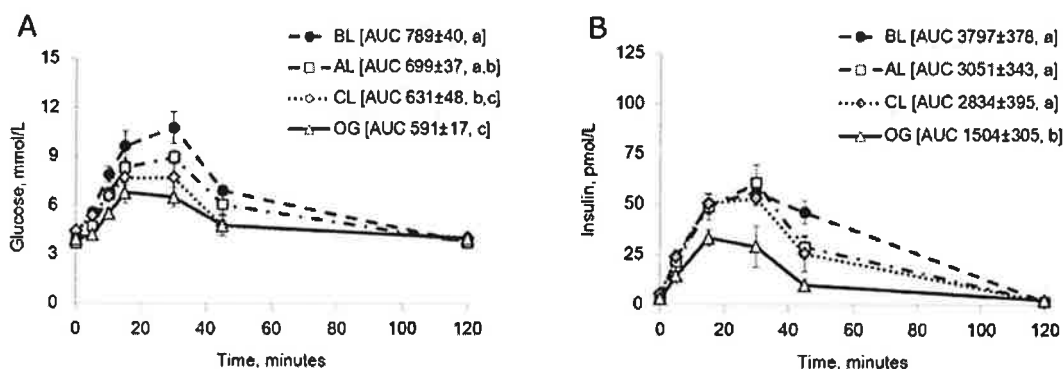


Ryc. 6. (A, B) Stężenia glukozy we krwi w równoległych próbkach krwi pobranych z żyły wrotnej (A) i żyły szyjnej (B) podczas GTT od jednej ze świń DJB przedstawionych na ryc. 5 (publ. 3).

Badania na szczurach uwidocznily ważną rolę początkowego odcinka jelita czczego, w porównaniu do jego dystalnej części, w kontrolowaniu wchłaniania glukozy i homeostazy [54, 55]. Badania własne na świniami DJB z chirurgicznie wytworzonymi pętlami jelitowymi potwierdziły tą zależność (Ryc. 7A i 8A).



Ryc. 7. (A, B) Stężenie glukozy we krwi (A) i insuliny w osoczu (B) podczas GTT, infuzja glukozy bezpośrednio do pętli żółciowo-trzustkowej (BL), w porównaniu do doustnej prowokacji glukozą (OG), u świń DJB. Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ) z wartościami AUC pokazanymi w nawiasach. Różne litery przedstawione z wynikami wskazują różnice statystycznie istotne ( $p < 0,05$ ) między grupami (publ 3).



Ryc. 8. (A, B) Stężenie glukozy we krwi (A) i insuliny w osoczu (B) podczas GTT - infuzja glukozy do pętli żółciowo-trzustkowej (BL), pętli pokarmowej (AL) lub pętli jelitowej (CL), w porównaniu do doustnej prowokacji glukozą (oralna glukoza; OG) u świń DJB. Dane przedstawione jako średnia  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) z wartościami AUC pokazanymi w nawiasach. Różne litery podane z wynikami wskazują różnice statystycznie istotne ( $p < 0,05$ ) między grupą kontrolną a grupami otrzymującymi infuzję glukozy do różnych pętli jelitowych (publ. 3).

Stymulacja (infuzja glukozy) glukożą bezpośrednio do pętli BL, skutkowała wyższym wchłanianiem glukozy i wyższą wartością AUC dla glukozy, niż ta obserwowana po doustnym podaniu glukozy lub podaniu glukozy do pokarmowych lub wspólnych pętli jelitowych. Wyniki te są zgodne z sugestią, że ilość wchłoniętej glukozy i wynikające z niej wydzielanie insuliny zmienia się, w zależności od różnej ekspresji różnych transporterów glukozy w różnych segmentach jelitowych [56]. Z drugiej strony, wyniki uzyskane po operacjach bariatrycznych u ludzi i w modelu szczurzym wskazują na zwiększoną liczbę niejelitowych transporterów glukozy 1 (glucose transporter 1 - GLUT1) na błonie podstawno-bocznej enterocytów w pętli pokarmowej (AL), które zwiększają wychwyt i wykorzystanie krążącej glukozy we krwi przez komórki nabłonka jelitowego [57, 58].

Wyniki badań własnych sugerują, że amylaza lub jej peptydy podawane do omijanej przez pokarm pętli BL, wzbudzają sygnalizację, która skutkuje zwiększonym wychwytem i metabolizmem glukozy w enterocytach (Ryc. 5A).

Aby lepiej zrozumieć mechanizm usprawniający metabolizm glukozy u pacjentów bariatrycznych, należy również rozważyć mechanizmy sprzężenia zwrotnego zaangażowanego w regulację wydzielania enzymów trzustkowych. Ze względu na operację DJB brak jest enzymów trzustkowych w pętli AL, a także w pętli wspólnej CL wytwarzającego sygnały sprzężenia zwrotnego, które zwiększa wydzielanie enzymów trzustkowych, m.in. amylazy, zwiększając metabolizm glukozy w błonie śluzowej jelita. Ponadto, w pętlach AL i CL u pacjentów po operacjach bariatrycznych, jak również w modelu świni projektu autorskiego, niższa absorpcja glukozy (ryc. 8A) może być zależna od obecności nieaktywnej amylazy ślinowej w tych pętlach.

Innym wnioskiem autorskiego badania było stwierdzenie, że doustne podawanie mieszaniny enzymów trzustkowych (Creon®) zdrowym, rosnącym świniom zmniejsza odpowiedź insuliny w osoczu (Ryc. 4B) na dożylną prowokację glukozą z równoczesnym zmniejszeniem eliminacji glukozy (Ryc. 4A). To rozszerza wcześniejsze wyniki własne, w których wykazano, że suplementacja enzymami trzustkowymi obniża odpowiedź insulinową, jak również poprawia utylizację glukozy podczas IVGTT u świń modelu EPI [59]. Wykazano również, że podawanie doustnej amylazy pochodzenia mikrobiologicznego powodowało zmniejszenie odpowiedzi insuliny na IVGTT świń grupy kontrolnej [60]. Hamujący wpływ na poziomy insuliny w osoczu sugerował, że enzymy trzustkowe, najprawdopodobniej amylaza i / lub jej peptydy/, można opisać przede wszystkim jako prandialne "decretynowe" czynniki, które działają z światła przewodu pokarmowego (ryc. 1B i 8B) w celu regulowania ilości insuliny w surowicy [61]. Istotnym pytaniem badawczym była odpowiedź na pytanie, czy hamowanie wydzielania insuliny wynika pośrednio z powodu zwiększonej jej degradacji w wątrobie czy poprzez bezpośrednio zmniejszoną produkcję komórek beta. Czynniki, które zmniejszają stężenie glukozy we krwi po spożyciu posiłku, niezależnie od insuliny, mogą pomóc w odroczeniu odczuwania braku insuliny i obniżyć ryzyko otyłości i opóźnić wystąpienie cukrzycy typu 2. Regulacja / inicjacja niezależnego od insuliny usuwania glukozy przez amylazę i peptydy pochodne amylazy może chronić komórki beta trzustki przed nadmierną stymulacją, ostatecznym wyczerpaniem i śmiercią komórek, co zwykle występuje w ciągu lat nadprodukcji insuliny.

Możliwość regulacji poziomu glukozy we krwi przez amylazę jest prawdopodobnie ważna we wczesnych etapach rozwoju u noworodków, które wytwarzają dość dużą ilość amylazy trzustkowej, chociaż są karmione wyłącznie mlekiem matki nie zawierającym skrobi. W związku z tym, aby stworzyć bardziej odpowiedni model świni niedonoszonego i donoszonego ludzkiego noworodka do badań nad metabolizmem lipidów i glukozy, był priorytetowym celem dalszych badań własnych.

#### **Publikacja 4**

W publikacji (4) przedstawiono próbę poprawy wyników przeżycia dla istniejących świńskich modeli ludzkich wcześniaków i urodzonych o czasie.

Przeprowadzono dwa oddzielne eksperymenty. W pierwszym doświadczeniu, urodzone o czasie prosięta otrzymały dożylnie (iv) - żyła pępkowa oczyszczoną świńską immunoglobulinę (Ig) lub surowicę świni, a wzrost i przeżywalność tych prosiąt porównywano do prosiąt karmionych siarą świńską zawierającą Ig. W drugim doświadczeniu, wcześniaki świń uzyskane w wyniku zabiegu cięcia cesarskiego otrzymały oczyszczone świńskie Ig natychmiast po urodzeniu przez podanie do żyły pępowinowej. Te prosięta były wyposażone operacyjnie (24-48 godzin po urodzeniu) w specjalną kaniulę żołądkową, która był wykorzystywana do karmienia prosiąt mlekiem w ciągu 2 tygodni. Przed założeniem kaniuli żołądkowej prosiaki wcześniaki były karmione sondą.

W trakcie doświadczeń, w badaniu fizykalnym prosięta wcześniaki nie wykazywały żadnych objawów zaburzeń żołądkowo-jelitowych lub ogólnoustrojowych, takich jak gorączka, rozdęcie brzucha, krwawe stolce, zatrzymanie pokarmu w żołądku lub wymioty. Prosięta nie wymagały wspomagania oddechowego ani krążeniowego. Zarówno wcześniaki jak i donoszone prosięta oddawały mocz kilka razy dziennie i nie zauważono anurii. Wszystkie grupy były czujne i aktywne między przerwami w karmieniu, z wyjątkiem grupy kontrolnych prosiąt karmionych tylko mieszanką dla niemowląt bez suplementu Ig, które były letargiczne i apatyczne. Grupa kontrolna prosiąt również wykazywała wodnistą biegunkę, podczas gdy prosięta pozostałych grup miały prawidłowe stolce.

W przedstawionym badaniu wykazano, że model prosięcia dla niedonoszonych i donoszonych noworodków ludzkich musi być wspomagany świńską Ig w stosownej ilości, aby zapewnić odpowiedni wzrost zwierząt i specyficzną dla prosiąt czujność i witalność (Tabela 1).

**Tabela 1. Masa ciała, przyrosty dzienne. TP – proteiny całkowite; IgG - immunoglobuliny G u prosiąt. (publ. 4)**

Grupy	Time	1 (n=6)	2 (n=6)	3 (n=6)	4 (n=6)	5 (n=15)
Masa ciała (kg)	0 h	1.40±0.45	1.43±0.28	1.15±0.18	1.27±0.52	1.14±0.20
	48 h	1.55±0.52	1.33±0.52	1.27±0.28	1.15±0.30	1.15±0.24
	14 d	-	-	-	-	1.33±0.22
Przyrosty dzienne (g/kg/d)		53.6±0.78a	34.9±0.47b	50.4±0.35c	45.8±0.54d	11.9±0.32e
TP (mg/ml)	0 h	18.2±2.8a	15.8±1.9a	15.9±1.3a	21.3±2.0a	17.0±2.2a
	48 h	25.0±1.9b	24.4±0.1b	36.4±3.6c	19.7±3.1a	24.5±1.2b
	14 d	-	-	-	-	23.9±2.2ab
IgG (mg/ml)	0 h	0.13±0.03a	0.08±0.02a	0.07±0.01ab	0.08±0.02ab	0.05±0.02b
	48 h	5.60±1.30c	1.80±0.08d	9.8±0.01e	0.06±0.01ab	5.70±1.60c
	14 d	-	-	-	-	4.40±1.40c

Wyniki przedstawiono jak średnie± SD na początku i końcu doświadczenia. (Grupa 1. Prosięta nowonarodzone, które otrzymały dożylną infuzję immunoglobulin, n=6; Grupa 2. Prosięta nowonarodzone, które otrzymały dożylną infuzję surowicy świni, n=6; Grupa 3, Prosięta nowonarodzone, które otrzymały kolostrum *per os*, n=6; Grupa 4, Karmione Similakiem – formuła mleka prosięta nowonarodzone, n=6; Grupa 5, Prosięta wcześniaki otrzymujące dożylną infuzję immunoglobulin, n=15. Różne litery podane z wynikami w rzędach wskazują na różnice statystyczne, gdzie  $p < 0.05$ .

Ponadto użycie kaniul żołądkowych uprościło karmienie i pozwoliło wykonywać dłuższe obserwacje. Wykazano, że dożylna infuzja świńskiej Ig zaraz po urodzeniu prowadzi do zwiększenia poziomu immunoglobuliny G (immunoglobulin G – IgG) w surowicy zarówno u prosiąt urodzonych o czasie, jak i wcześniaków, przynosi podobne korzyści jak karmienie siałą w pierwszych 24 godzinach życia. W badaniach innych autorów, wcześniaki świń otrzymywały infuzje surowicy loch, aby stworzyć odporność bierną [62]. Jednak zbyt mała ilość Ig w surowicy nie była w stanie chronić zwierząt przed rozwojem martwiczego zapalenia jelit. Należy nadmienić, że wyniki własne wykazały, że prosięta donoszone i te, które otrzymywały surowicę świń w ilościach rekomendowanych przez Shen et al. [62], wykazały istotnie podwyższone poziomy IgG i białka całkowitego (total protein – TP) w osoczu w porównaniu do prosiąt karmionych mlekiem modyfikowanym bez jakiegokolwiek suplementacji Ig. Jednak ilości IgG w osoczu tych prosiąt były znacznie

niższe niż obserwowane u prosiąt otrzymujących oczyszczone Ig lub karmionych siarą. Nowo narodzone prosięta, które nie otrzymały żadnej formy wsparcia immunologicznego, wykazywały niskie poziomy IgG i TP w osoczu (Tabela 1). W rzeczywistości poziomy TP wydawały się zmniejszać w ciągu 48 godzin po urodzeniu. To wydaje się miało istotny negatywny wpływ i doprowadziło do pogorszenia ogólnego stanu zdrowia prosiąt, w tym do rozwoju apatii i wodnistej biegunki.

Podsumowując, w oparciu o wyniki badań własnych, stwierdzono, że pasywne wsparcie immunologiczne zapewniane przez wchłanianie siary lub wczesny wlew Ig jest kluczowe dla przeżywalności i ogólnego dobrostanu noworodków i wcześniaków.

### Publikacja 5

Opracowanie odpowiedniego modelu wcześniaka świni umożliwiło zbadanie związku między poziomem amylazy w osoczu, a poziomem insuliny u rosnących świń. Dane przedstawione w publikacji (5) zebrano w tabeli 2.

**Tabela 2. Poziom glukozy, aktywnością amylazy i stężeniem insuliny w osoczu u świń podczas dojrzewania (publ.5).**

Poziomy przedjedzeniowe Plazma/krew	Wcześniaki (n=18)	Prosięta donoszone (n=4)	1-dno miesięczne (n=3)	2-u miesięczne (n=3)	3-y miesięczne (n=3)
Glukoza, mmol/L	3.0±0.2	2.8±0.4	4.0±0.1	4.5±0.1	4.2±0.2
Insulina, pmol/L	n.d.	n.d.	2.7±0.7	3.1±0.2	3.3±0.6
Amylaza, U/L	539±17 <sup>ab</sup>	642±94 <sup>a</sup>	490±107 <sup>ab</sup>	440±82 <sup>ab</sup>	309±11 <sup>b</sup>
Waga ciała, kg	1.05±0.05	1.30±0.05	7.50±0.26	10.80±0.06	23.53±1.13

Dane przedstawiono jako średnie ± SEM. Różne litery podane przy wynikach w tym samym wierszu wskazują różnice statystyczne między grupami,  $p \leq 0,05$ . n.d. - nie wykryto.

Przedstawione wyniki wskazują na obecności amylazy w krążeniu w ilości odwrotnie proporcjonalnej do poziomu insuliny podczas procesu dojrzewania organizmu. Inna zależność między insuliną a amylazą trzustkową została wcześniej wykazana w modelu szczurzym, gdzie stymulowana glukoza odpowiedź insulinowa była związana ze wzrostem składnika amylazowego w zewnątrzwydzielniczej części trzustki, a jednocześnie stwierdzono zmniejszenie stężenia chymotrypsynogenu i lipazy [63]. Wyniki aktualnego i poprzedniego badania własnego [64] sugerują, że amylaza we krwi może obniżyć wydzielanie insuliny przez pośredni udział we wchłanianiu glukozy.

Powszechnie wiadomo, że noworodki świni są używane jako model do badania układu pokarmowego wcześniaków [65].

W poprzednim badaniu [66] stwierdzono, że niedobory insuliny w osoczu wzrosły u wcześniaków świń na wskutek wzrostu poziomu glukozy we krwi, co sugeruje niedojrzałą reakcję osi glukozy-insuliny u młodych prosiąt. Na podstawie wcześniej uzyskanych danych założono, że amylaza może stymulować enterocyty – do metabolizmu glukozy a nie tylko jej transportu.

Zwiększone poziomy amylazy w osoczu obserwowane u nowonarodzonych prosiąt obserwowano także u niemowląt [36]. Biorąc pod uwagę brak specyficznych substratów we krwi dla enzymatycznego działania amyl litycznego, możliwe jest, że poziomy amylazy we krwi są w pewnym stopniu odpowiedzialne za regulację wchłaniania węglowodanów w tym wieku. Stosunek aktywności insuliny w osoczu do aktywności amylazy w osoczu może być ważnym wskaźnikiem, który często jest pomijany.

Zwiększony poziom amylazy we krwi obserwowany po operacji bariatrycznej dwunastnicy może również być powiązany z powszechnie notowaną poprawą wrażliwości na insulinę po takiej operacji. Wysokie poziomy amylazy we krwi są często związane ze zwiększoną trzustkową produkcją amylazy i jej późniejszym wydzielaniem do krwioobiegu. Już w 1933 roku Reid i in. (1933) donosili o zwiększonej aktywności amylazy krwi u pacjentów z cukrzycą, którzy stosują specyficzną dietę, a nie leczenie insuliną [30]. To odkrycie potwierdza autorskie wyniki, sugerując ujemną korelację pomiędzy poziomem insuliny we krwi a poziomem amylazy we krwi. Poziom amylazy we krwi stopniowo wzrastał w zastosowanym modelu świni DJB po operacji. Operacja DJB wywołuje fizjologiczną niewydolność trawienną, która poprzez naturalne mechanizmy sprzężenia zwrotnego pobudza zewnątrzwydzielniczą funkcję trzustki, co może prowadzić do zwiększonej aktywności amylazy w osoczu. Warto zauważyć, że jest to jedynie sugestia dotycząca możliwego działania regulacyjnego amylazy we krwi tylko na poposiłkową hiperglikemię i odpowiedź insulinową, a nie na bazowe poziomy glukozy i insuliny w osoczu.

Wyniki uzyskane po wlewie dożylnym amylazy wskazują, że jest ona w stanie regulować stymulowaną glukozą reakcję insulinową. Infuzja amylazy znacząco obniżyła odpowiedź insulinową, a także obniżyła poziom peptydu C. Znaczenie amylazy w krążeniu jest więc oczywiste, w przypadku zewnątrzwydzielniczej niewydolności trzustki organizm może próbować znormalizować poziom amylazy we krwi, używając innych źródeł amylazy. Może to tłumaczyć zaskakująco wysokie poziomy amylazy w osoczu identyfikowane podczas zewnątrzwydzielniczej niewydolności trzustki [64].



**Publikacja 6**

Ostatnia publikacja (6) prezentowanego cyklu wprowadza koncepcję komunikacji osiowej pęcherzykowo-wysepkowo-pęcherzykowej (AIA), która może odgrywać istotną rolę w rozwoju otyłości i cukrzycy typu 2.

Hipoteza własna zakładała, że dożylna amylaza może być odpowiedzialna za zmniejszenie wchłaniania glukozy do krwi, a w konsekwencji obniżyć ilość wydzielanej insuliny. Wyniki otrzymane wskazują, że jelito stymulowane przez amylazę lub jej peptydy, aktywnie uczestniczy w regulacji ilości glukozy wchłoniętej do krwi poprzez jej wykorzystywanie w metabolizmie jelita. Można przyjąć, że jelito pod wpływem amylazy aktywnie ogranicza dostępność glukozy do centralnego metabolizmu. Obecność peptydów z amylazy lub amylazy w jelitach zmniejszają wchłanianie glukozy do krwi obwodowej, a jednocześnie ograniczają uwalnianie insuliny. Fakt ten wskazuje na istnienie zależnego od jelit mechanizmu zależnego od amylazy, który reguluje stężenia glukozy we krwi w sposób niezależny od insuliny. Dogłębne zrozumienie mechanizmów regulacyjnych zaangażowanych w wyżej wymienione zjawisko może być kamieniem milowym w walce z otyłością i cukrzycą. Glukoza nie będzie stymulować uwalniania insuliny i nie będzie przekształcana w tłuszcz, gdy zahamowane zostanie jej wchłanianie do krwiobiegu. Nie będzie skutkowała rozwojem cukrzycy typu 2 i insulinooporności. Śluzówka jelita jest więc prawdopodobnie kompartmentem, w którym glukoza jest metabolizowana w sposób bezpośrednio zależny od poziomu amylazy, i niezależnym od insuliny.

**Podsumowanie cyklu prac wchodzących w skład habilitacji**

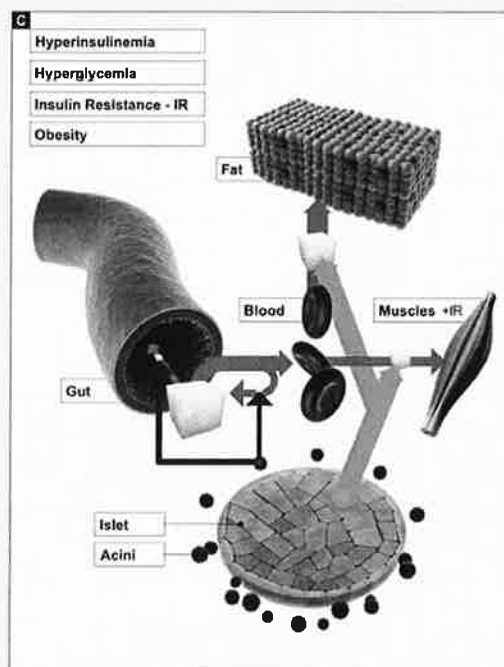
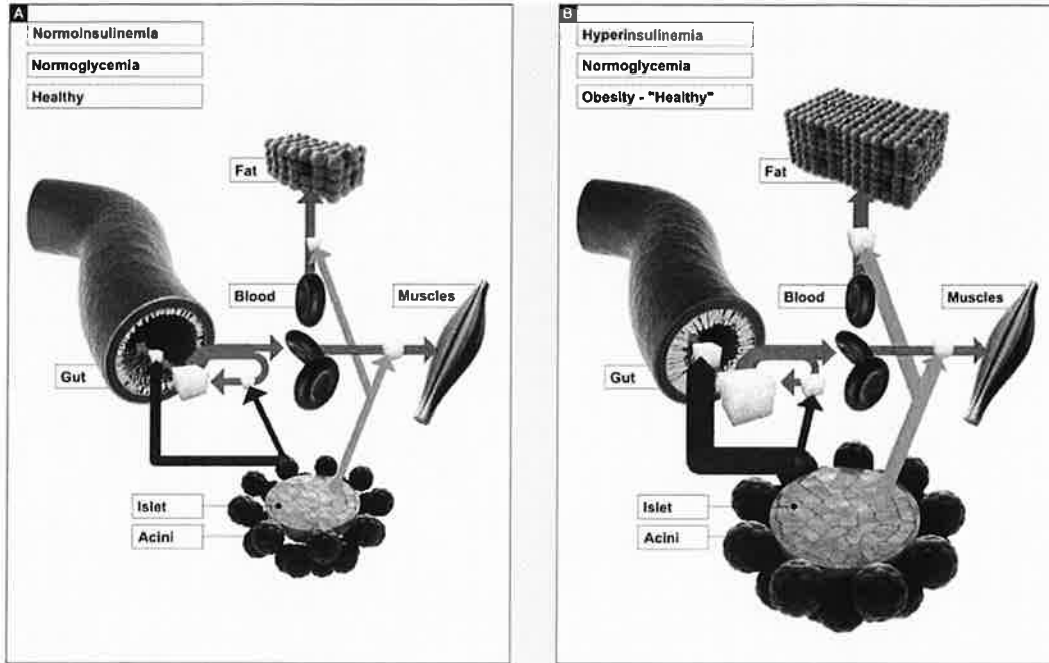
Niekwestionowana rola insuliny i glukagonu w metabolizmie glukozy jak i nieswoiste działania enzymów trzustkowych w jelitach a zwłaszcza amylazy zarówno z jelit jak i z krwi na poziom i wchłanianie glukozy przedstawione w obecnym cyklu publikacji podkreślają centralną rolę trzustki, działającej jako pojedynczy narząd, w rozwoju otyłości i rozwoju cukrzycy typu 2.

Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono, że zastosowanie amylazy stanowi istotny krok do opóźniania /zapobiegania rozwojowi otyłości, cukrzycy typu 2 i w leczeniu tych stanów w warunkach klinicznych.

Przedstawiono wyniki badań własnych, upoważniają do sformułowania wniosku o istnieniu dwóch poziomów regulacji funkcji trzustki:

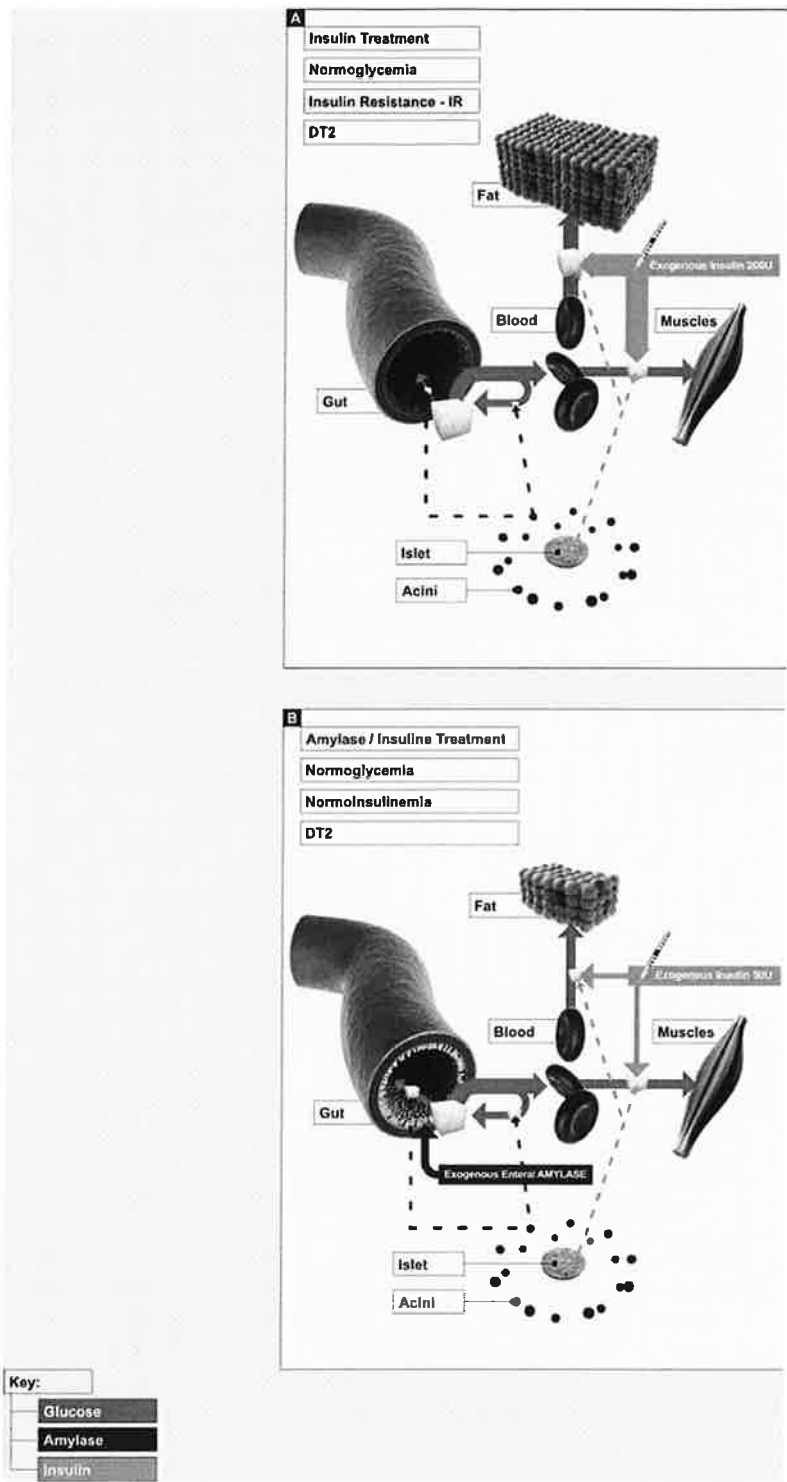
1. Na poziomie wewnątrz trzustkowym, gdzie insulina i inne hormony wysepkowe wpływają lokalnie na wytwarzane enzymów trzustki poprzez wewnątrztrzustkowy specyficzny układ krążenia, w którym krew tętnicza zaopatrująca wysepki trzustki wypływa z nich nadal jako krew tętnicza zaopatrująca komórki pęcherzykowe. Ale wtedy ta krew tętnicza wypływająca z wysepek trzustki bogata jest w produkty (insulina, glukagon, etc.) komórek wysepkowych. Tak właśnie wygląda swoisty układ krążenia tętniczo- tętniczy trzustki [24]. W tym samym czasie enzymy trzustkowe „wyciekają” do płynu interstycjalnego wpływają na zasadzie sygnalizacji parakrynej na komórki wyspowe i produkcję hormonów.
2. Na poziomie ogólnoustrojowym, gdzie amylaza reguluje homeostazę glukozy poprzez powodowanie jej wykorzystania w błonie śluzowej jelita. W ten sposób ogranicza ilość insuliny wymaganej do metabolizowania glukozy w tkankach peryferyjnych (Ryc. 9 A-D i 10 A, B).

*Kateryna Pierzynowska*



Key:

	Glucose
	Amylase
	Insulin



Ryc. 9 (A – C) i Ryc. 10 (A, B). Schemat współdziałania amylazy i insuliny w metabolizmie glukozy (publ. 6). Opracowanie na podstawie wyników badań własnych.

5. Dyskusja o innych osiągnięciach naukowo-badawczych - w oparciu o prace recenzowane

**Wstępne trawienie preparatu dla niemowląt za pomocą lipazy drobnoustrojowej poprawia wchłanianie i przyrost LCPUFA w modelu świni EPI**

**Goncharova K**, Kirko S, Grujic D, Kardas M, Grochowska-Niedworok E, Prykhodko O, Woliński J, Ushakova G, Lozinska L, Pierzynowski SG. Enhanced absorption of long-chain polyunsaturated fatty acids following consumption of functional milk formula, pre-digested with immobilized lipase ex vivo, in an exocrine pancreatic insufficient (EPI) pig model. *J Funct Foods*, 2017, 34: 422-430.

W prezentowanych badaniach wykorzystano model świni z zewnątrzwydzielniczą niewydolnością trzustki, który naśladuje minimalną lub nieobecną funkcję trzustki u ludzkich niemowląt lub pacjentów z mukowiscydozą lub upośledzoną czynnością zewnątrzwydzielniczą trzustki. Model ten umożliwił nam zbadanie udziału wstępnego trawienia tłuszczu w preparatach dla niemowląt za pomocą immobilizowanej lipazy mikrobialnej (immobilized microbial lipase – iML) na wchłanianie i akrecję tkankową wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (long-chain polyunsaturated fatty acids – LCPUFA). Ocenę wchłaniania i akrecji tłuszczu przeprowadzono na podstawie pomiarów zawartości tłuszczu kałowego i LCPUFA w osoczu, wybranych tkankach i stolcach.

Uzyskane wyniki wskazują, że preparaty mleczne dla niemowląt, wstępnie strawione przez iML, było dobrze tolerowane przez prosięta. Nie stwierdzono żadnych niepożądanych objawów klinicznych związanych ze spożywaniem wstępnie trawionych preparatów mleka dla niemowląt lub patologicznych pośmiertnych zmian makroskopowych po okresie 6 tygodni stosowania wstępnie trawionego preparatu mleka. Wszystkie prosięta dostosowały się do trybu żywienia w okresie adaptacji. Wykazano, że wstępne trawienie trójglicerydów za pomocą iML może pomóc w zmniejszeniu niedoboru kwasów tłuszczowych. Pochodzenie mikrobiologiczne iML eliminuje ryzyko przeniesienia wirusów zwierzęcych. Zebrane dane dotyczące wydalania tłuszczu z kałem i profilu lipidów we krwi pozwalają nam zasugerować, że wstępne trawienie mleka dla niemowląt za pomocą immobilizowanej lipazy pochodzenia mikrobiologicznego prowadzi do znaczącej poprawy wchłaniania witamin A i E i tłuszczu, w tym absorpcji LCPUFA. Jak wiadomo, wczesne podawanie  $\omega$ -6 i  $\omega$ -3 LCPUFA może

łagodzić wpływ niedotlenienia i uszkodzeń oksydacyjnych, wpływając w ten sposób na powrót do zdrowia po uszkodzeniu mózgu siatkówki, płuca, jelita, wątroby czy skóry szczególnie w przypadku dzieci przedwcześnie urodzonych [67]. Dlatego ocena przyrostu LCPUFA w tkance trzewnej i nerwowej była dla nas niezwykle ważna. W niniejszym badaniu zaobserwowano znaczny wzrost akrecji - odkładania kwasu arachidonowego (arachidonic acid - ARA) w tkance tłuszczowej, sercu, wątrobie i hipokampie. Jeśli chodzi o kwas dokozaheksaenowy (docosahexaenic acid - DHA), zaobserwowano tendencję do zwiększenia akrecji w wyżej wymienionych tkankach.

Podsumowując, na podstawie danych uzyskanych w niniejszym badaniu można powiedzieć, że wstępne trawienie *ex vivo* preparatów mleka dla niemowląt za pomocą immobilizowanej lipazy mikrobialnej znacznie zwiększa biodostępność LCPUFA z takich preparatów mlecznych.

### **Doustna urykaza eliminuje kwas moczowy we krwi w hiperuremicznym modelu świni.**

Szczurek P, Mosiichuk N, Woliński J, Yatsenko T, Grujic D, Lozinska L, Pieszka M, Święch E, Pierzynowski SG, **Goncharova K.** Oral uricase eliminates blood uric acid in the hyperuricemic pig model. PLoS One. 2017 June 8;12(6):e0179195.

Hiperurykemia (hyperuricemia – HUA) to podwyższone stężenie kwasu moczowego (uric acid – UA) we krwi u ludzi [68]. Gdy przekroczony zostanie fizjologiczny próg nasycenia dla UA, tworzenie się i odkładanie kryształów moczanu (tophi) występuje we wszystkich tkankach [69]. HUA jest silnie związany z szeregiem zaburzeń, w tym kamieni nerkowych, otyłości, cukrzycy, zespołu metabolicznego, nadciśnienia, chorób sercowo-naczyniowych, raka i dny [70-72]. Do tej pory model HUA został opracowany tylko u gryzoni. Celem naszego badania było opracowanie modelu świni do badania pozanerkowej eliminacji UA przez jelita, oraz zbadanie zdolności doustnego podawania urykazy, z *Candida utilis*, w zmniejszaniu stężeń UA w osoczu u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek (chronic kidney disease – CKD) z indukowaną HUA.

Ograniczenie czynności nerek do 10% (po nefrektomii 9/10) nie zwiększyło stężenia UA w osoczu u świń zastosowanych w bieżącym badaniu. Jednakże nefrektomizowane świni wykazywały podwyższone stężenia kreatyniny w osoczu, co wskazuje na zmniejszoną czynność nerek. Niestety, nie ma możliwości dokładnego

oszacowania wyniku operacji nefrektomii, dlatego była konieczność opracowania projektu badań krzyżowych.

W prezentowanym badaniu zwiększono stężenia UA w osoczu u świń przez dożylnie podawanie (co 30 minut przez 8 godzin) zawiesiny UA do krwi obwodowej, w dawce 5 mg / kg masy ciała. Uzyskano stabilny świński model łagodnej HUA (około 4 mg / dL) przez 8 godzin. W celu zbadania, czy UA eliminuje się przez jelita u świń, tak jak jest u ludzi, porównaliśmy stężenie UA w osoczu krwi żyły szyjnej, przedstawiające obwodowe stężenia krążącego UA z wartością we krwi żyły wrotnej, reprezentujące stężenia UA z trzewnego krążenie krwi po infuzji UA. Uzyskane wyniki wyraźnie potwierdzają, że UA, po osiągnięciu pewnego progu (poziomu) w osoczu, w przypadku świni 7 mmol/l, jest również eliminowany przez jelita u świń, podobnie jak u ludzi. Wyniki uzyskane w niniejszym badaniu wykazały, że wysokie stężenia UA w osoczu można zmniejszyć poprzez doustne podawanie urykazy.

Podsumowując, wyniki uzyskane w niniejszym badaniu w modelu świńskiej sugerują możliwość zmniejszenia stężenia UA w osoczu u pacjentów z HUA i upośledzoną czynnością nerek po doustnej terapii urykazą pochodzenia mikrobiologicznego, która prawdopodobnie zwiększa eliminację UA przez jelita. Takie podejście może stanowić alternatywną i bezpieczną terapię w leczeniu HUA u pacjentów z atenuowanym GFR, jak wyraźnie manifestuje się w CKD.

### **Znaczenie przeniesienia immunoglobulin matczynej na funkcje poznawcze i plastyczność neuronalną - badanie nowonarodzonego modelu prosiaka.**

**K. Goncharova, E. Arevalo Sureda, J. Wolinski, L. Lozinska, B. Weström, S.G. Pierzynowski**  
Importance of maternal immunoglobulin transfer for cognitive function and neuronal plasticity – study on newborn piglet model. Plos One. 2017 June 28 2(6):e0180002.

Nowo narodzone prosięta są ogólnie akceptowane jako odpowiedni model dla ludzkich noworodków. Prawdopodobnie wynika to z faktu, że podobne czynniki są zaangażowane w funkcjonalne i dojrzewanie mózgu u noworodka świńskiego jak i ludzkiego. W związku z tym, w niniejszym badaniu wykorzystaliśmy immunoglobuliny (Ig) świńskie w różnych dawkach, aby ocenić rolę we wczesnym okresie rozwoju po urodzeniowego. Ponadto, przetestowaliśmy także siarę bydlęcą, która poprawia funkcje jelitowe, trawienne i immunologiczne u wcześniaków [62] i jest obecnie badana

w klinicznym badaniu pilotażowym [73] jako pierwsze żywienie dojelitowe dla wcześniaków. W prezentowanych badaniach dokonano oceny zmian funkcjonalnych i strukturalnych hipokampu prosiąt przez badanie białek synaptycznych i neuronalnych związanych z plastycznością, a także pomiary zmian zachowań prosiąt. W odniesieniu do transferu Ig z krążenia do płynu mózgowo-rdzeniowego, obecne dane wykazały przejście zarówno swoistych dla danego gatunku (świnia), jak i obcych (bydłęcych) IG przez BBB u nowonarodzonych świń. To odkrycie jest jednak sprzeczne z danymi uzyskanymi przez Haradę i in. [74], które wykazały, że przepuszczalność BBB u nowonarodzonych prosiąt była wyłącznie dla swoistych dla gatunku Ig. Co więcej, przeniesienie swoistych gatunkowo Ig przez BBB wydaje się być zależne od dawki prosiąt, ponieważ zwierzęta, które miały najwyższe poziomy IgG w krążeniu, miały również najwyższe poziomy IgG w płynie mózgowo-rdzeniowym (cerebrospinal fluid – CSF). Aby oszacować rozwój neuronów, migrację i dojrzewanie, przeanalizowano zawartość białek neuronowych związanych z plastycznością tkanki hipokampa u prosiąt. Udokumentowano również, że ilość neurospecyficznych białek, takich jak białko związane z wzrostem 43 (growth associated protein 43 - GAP43), doublekortina (doublecortin – DCX), białko związane z mikrotubulami 2 (microtubule-associated protein 2 – MAP2), jak również liczba synaptophysino-pozytywnych i synaptopodino-pozytywnych miejsc wydają się zależeć od suplementacji Ig świńskiej. Co więcej, prosięta, które były całkowicie pozbawione Ig specyficznych dla gatunku wykazywały zmniejszoną aktywność eksploracyjną i rozróżnianie zapachu w porównaniu do prosiąt, które otrzymały Ig zgodną gatunkowo.

Łącznie dane dotyczące plastyczności neuronalnej, zawartości białek związanych z synapsami i zachowania prosiąt pozwalają wnioskować, że obcogatunkowe (bydłęce) Ig, pomimo ich zdolności do przechodzenia przez BBB, nie może zapewnić właściwego neuronowego odnajdywania ścieżki, migracji i dojrzewania synaptycznego, a także rozwoju specyficznych dla gatunku wzorców behawioralnych (w odróżnieniu od gatunku świńskiego Ig). Tak więc, znane już korzystne efekty suplementacji dożylniej Ig są prawdopodobnie spowodowane nie tylko immunologicznymi, ale także pewnymi "poza immunologicznymi" właściwościami IG – związanym np. z dojrzewaniem komórek nerwowych czy śluzówki jelit.

Podsumowując, dane na temat zachowania prosiąt, rozwoju neuronalnego i plastyczności synaptycznej pozwalają zasugerować, że dyskryminacja i ukierunkowana przedmiotowa eksploracja prosiąt, a także dojrzewanie neuronów i rozwój synaptyczny zależą od dostarczenia wystarczającej ilości swoistych dla gatunku immunoglobulin.



Wykazano, że siara bydlęca jest na bieżąco badana w pilotażowych studiach klinicznych jako pierwsze żywienie dojelitowe dla wcześniaków [73]. Co więcej, przypuszcza się, że immunoglobuliny z bydlęcej siary mogłyby poprawić ogólny stan odpornościowy, ale nie byłyby wystarczające do poprawy rozwoju neurologicznego u wcześniaków, a szczególnie skrajnych wcześniaków. Dożylny wlew immunoglobulin stosuje się w praktyce klinicznej jako leczenie sepsy oraz terapie zapobiegające rozwojowi zakażeń u wcześniaków [75, 76], jednak jego możliwości neurorozwojowe są niedoszacowane. Pozytywny wpływ wlewu dożylnego swoistych dla gatunku immunoglobulin na zachowanie i plastyczność neuronalną, obserwowany w obecnym modelu prosięcia może być istotny w odniesieniu do klinicznego zastosowania immunoglobulin u wcześniaków, w celu zapewnienia odpowiedniego rozwoju mózgu i ochrony takich niemowląt przed rozwojem zaburzeń poznawczych w przyszłości.

### **Podsumowanie**

Wszystkie prace zarówno z cyklu habilitacyjnego, jak i inne prace nie związane bezpośrednio dotyczą funkcji przewodu pokarmowego w aspekcie rozwoju cywilizacyjnych schorzeń metabolicznych, takich jak otyłość, cukrzyca, dna, rozwój mózgu u wcześniaków i donoszonych noworodków, itp.

Badania zostały wykonane z wykorzystaniem modelu świni co potwierdza jego użyteczność jako zwierzęcia modelowego w badaniach biomedycznych monitorujących stan i przyczyny zaburzeń zdrowia publicznego.

*Kateryna Pierzynowska*

**Referencje:**

1. "Obesity and overweight Fact sheet N°311" WHO
2. [http://diabetesatlas.org/IDF\\_Diabetes\\_Atlas\\_8e\\_interactive\\_EN/](http://diabetesatlas.org/IDF_Diabetes_Atlas_8e_interactive_EN/)
3. Silink M. A United Nations Resolution on Diabetes The Result of a Joint Effort US Endocrinology, 2007; 1: 12-14.
4. Global report on diabetes, WHO, 2016.
5. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of comorbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. BMC Public Health 2009; 9: 88–107.
6. de Mutsert R, Sun Q, Willett WC, Hu FB, van Dam RM. Overweight in Early Adulthood, Adult Weight Change, and Risk of Type 2 Diabetes, Cardiovascular Diseases, and Certain Cancers in Men: a Cohort Study. Am J Epidemiol 2014; 179: 1353–1365.
7. Astrup A, Finer N. Redefining type 2 diabetes: 'Diabesity' or 'obesity dependent diabetes mellitus'? Obes Rev 2000; 1: 57–59.
8. Kokoszka A. Igłofobia oraz obawy przed zastrzykami u chorych na cukrzycę [http://diabetologiaonline.pl/lekarz\\_diabeto\\_adoz,info,92,0.html](http://diabetologiaonline.pl/lekarz_diabeto_adoz,info,92,0.html)
9. Ripsin CM, Kang H, Urban RJ. Management of blood glucose in type 2 diabetes mellitus. American Family Physician 2009; 79 (1): 29–36.
10. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E et al. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centred approach. Update to a Position Statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. Diabetologia 2015; 58 (3): 429–442.
11. Baeyens L, Bonné S, German MS, Ravassard P, Heimberg H, Bouwens L et al. Ngn3 expression during postnatal in vitro beta cell neogenesis induced by the JAK/STAT pathway. Cell Death Differ 2006; 13: 1892–1899.

12. Lemper M, Leuckx G, Heremans Y, German MS, Heimberg H, Bouwens L, Baeyens L. Reprogramming of human pancreatic exocrine cells to  $\beta$ -like cells. *Cell Death Differ* 2015; 22: 1117-1130.
13. Couture Y, Dunnigan J, Morisset J. Stimulation of pancreatic amylase secretion and protein synthesis by insulin. *Scand J Gastroenterol* 1972; 7: 257-263.
14. Kanno T, Saito A. The potentiating influences of insulin on pancreozymin-induced hyperpolarization and amylase release in the pancreatic acinar cell. *J Physiol* 1976; 261: 505.
15. Saito A, Williams JA, Kanno T. Potentiation of cholecystokinin-induced exocrine secretion by both exogenous and endogenous insulin in isolated and perfused rat pancreata. *J Clin Invest* 1980; 65: 777.
16. Pierzynowski S, Barej W. The dependence of exocrine pancreatic secretion on insulin in sheep. *Q J Exp Physiol* 1984; 69: 35-39.
17. Pierzynowski SG, Podgurniak P, Mikołajczyk M, Szczesny W. Insulin and the parasympathetic dependence of pancreatic juice secretion in healthy and alloxan diabetic sheep. *Q J Exp Physiol* 1986; 71: 401-407.
18. Pierzynowski SG, Weström BR, Svendsen J, Svendsen L, Karlsson BW. Development and regulation of porcine pancreatic function. *Int J Pancreatol* 1995; 18: 81-94.
19. Williams JA, Goldfine ID. The insulin-pancreatic acinar axis. *Diabetes* 1985; 34: 980-986.
20. Barreto SG, Carati CJ, Toouli J, Saccone GT. The islet-acinar axis of the pancreas: more than just insulin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 299: G10-G22.
21. Hellman B, Wallgren A, Petersson B. Cytological characteristics of the exocrine pancreatic cells with regard to their position in relation to the islets of Langerhans. *Acta Endocrinol* 1962; 39: 465-473.
22. Kramer M, Tan H. The peri-insular acini of the pancreas of the rat. *Cell Tissue Res* 1968; 86: 163-170.
23. Henderson J, Daniel P, Fraser P. The pancreas as a single organ: the influence of the endocrine upon the exocrine part of the gland. *Gut* 1981; 22: 158-167.
24. Lifson N, Kramlinger KG, Robert R, Lender J. Blood Flow to the Rabbit Pancreas with Special Reference to the Islets of Langerhans. *Gastroenterology* 1989; 79: 408-473.
25. Bank S, Marks IN, Vinik AI. Clinical and hormonal aspects of pancreatic diabetes. *Am J Gastroenterol* 1975; 64(1): 13-22.

26. Klöppel G, Bommer G, Commandeur G, Heitz P. The endocrine pancreas in chronic pancreatitis. Immunocytochemical and ultrastructural studies. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1978; 377(2): 157-174.
27. Sheikh S, Gudipaty L, De Leon DD, Hadjiliadis D, Kubrak C, Rosenfeld NK et al. Reduced  $\beta$ -cell secretory capacity in pancreatic-insufficient, but not pancreatic-sufficient, cystic fibrosis despite normal glucose tolerance. *Diabetes* 2017; 66(1): 134-144.
28. Larsen S, Hilsted J, Tronier B, Worning H. Pancreatic hormone secretion in chronic pancreatitis without residual beta-cell function. *Acta Endocrinol* 1988; 118(3): 357-364.
29. Botha JL, Vinik AI, Brown JC. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) in chronic pancreatitis. *Clin Endocrinol Metab* 1976; 42(5): 791-797.
30. Reid E, Myers VC. Studies on animal diastases. 4. The effect of insulin on the diastatic activity of the blood in diabetes. *J Biol Chem* 1933; 99: 607-613.
31. Janowitz HD, Dreiling DA. The plasma amylase: source, regulation and diagnostic significance. *American J Med* 1959; 27(6): 924-935.
32. Nothman MM, Callow AD. Investigations on the origin of amylase in serum and urine. *Gastroenterology* 1971; 60(1): 82-89.
33. Somogyi M. Blood diastase in health and diabetes. *J Biol Chem* 1940; 134: 315-318.
34. Reid C, Narayana B. Studies in blood diastase. Factors which cause variations in the amount of diastase in the blood. *Exp Physiol* 1930; 20(4): 305-311.
35. Dreiling DA, Rosenthal WS, Kass M, Janowitz HD. Relationship between blood amylase and factors affecting carbohydrate metabolism. *Dig Dis Sci* 1959; 4(9): 731-736.
36. Searcy RL, Berk JE, Hayashi S, Ackerman BD. Serum amylase activity in the newborn. *Pediatrics*. 1967; 39(2): 294-296.
37. Muneyuki T, Nakajima K, Aoki A, Yoshida M, Fuchigami H, Munakata H, et al. Latent associations of low serum amylase with decreased plasma insulin levels and insulin resistance in asymptomatic middle-aged adults. *Cardiovasc Diabetol* 2012; 11(1): 80.
38. Viljakainen H, Andersson-Assarsson JC, Armenio M, Pekkinen M, Pettersson M, Valta H, et al. Low copy number of the AMY1 locus is associated with early-onset female obesity in Finland. *PloS One*. 2015; 10(7): e0131883.
39. Mejía-Benítez MA, Bonnefond A, Yengo L, Huyvaert M, Dechaume A, Peralta-Romero J, et al. Beneficial effect of a high number of copies of salivary amylase AMY1 gene on obesity risk in Mexican children. *Diabetologia* 2015;58(2):290-294.

40. Gewert K, Holowachuk SA, Rippe C, Gregory PC, Erlanson-Albertsson C, Olivecrona G et al. The enzyme levels in blood are not affected by oral administration of a pancreatic enzyme preparation (Creon 10,000) in pancreas-insufficient pigs. *Pancreas* 2004; 28: 80-88.
41. Durie PR, Largman C, Brodrick JW, Johnson JH, Gaskin KJ, Forstner GG, Geokas MC. Plasma immunoreactive pancreatic cationic trypsinogen in cystic fibrosis: a sensitive indicator of exocrine pancreatic dysfunction. *Pediatr Res* 1981; 15(10): 1351-1355.
42. Köhn HD, Wider G, Bayer PM, Mostbeck A. Immunoreactive trypsin, alpha-amylase and lipase in serum - is there an age-dependence? *Clin Biochem* 1982;15(1): 49-51.
43. Lindqvist A, Ekelund M, Garcia-Vaz E, Ståhlman M, Pierzynowski S, Gomez MF et al. The impact of Roux-en-Y gastric bypass surgery on normal metabolism in a porcine model. *PloS One* 2017; 12: e0173137.
44. Lindqvist A, Ekelund M, Pierzynowski S, Groop L, Hedenbro J, Wierup N. Gastric bypass in the pig increases GIP levels and decreases active GLP-1 levels. *Peptides* 2017; 90: 78-82.
45. Christoffersen B, Ribel U, Raun K, Golozoubova V, Pacini G. Evaluation of different methods for assessment of insulin sensitivity in Gottingen minipigs: introduction of a new, simpler method. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297: R1195-R1201.
46. Pierzynowski SG, Weström BR, Svendsen J, Svendsen L, Karlsson BW. Development and regulation of porcine pancreatic function. *Int J Pancreatol* 1995; 18: 81-94.
47. Bradley D, Magkos F, Klein S. Effects of bariatric surgery on glucose homeostasis and type 2 diabetes. *Gastroenterology* 2012; 143: 897-912.
48. Mandel AL, Breslin PA. High endogenous salivary amylase activity is associated with improved glycemic homeostasis following starch ingestion in adults. *J Nutr* 2012; 142: 853-858.
49. Lee JG, Park SW, Cho BM, Lee S, Kim YJ et al. Serum amylase and risk of the metabolic syndrome in Korean adults. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 1848-1853.
50. Nakajima K, Nemoto T, Muneyuki T, Kakei M, Fuchigami H, Munakata H. Low serum amylase in association with metabolic syndrome and diabetes: a community-based study. *Cardiovasc Diabetol* 2011; 10: 34.
51. Falchi M, El-Sayed Moustafa JS, Takousis P, Pesce F, Bonnefond A et al. Low copy number of the salivary amylase gene predisposes to obesity. *Nat Genet* 2014; 46: 492-497.
52. Srivastava L, Hübscher G. Glucose metabolism in the mucosa of the small intestine:

- Enzymes of the pentose phosphate pathway. *Biochem J* 1966; 101: 48-55.
53. Mithieux G, Gautier-Stein A. Intestinal glucose metabolism revisited. *Diabetes Res Clin Pract* 2014; 105: 295–301.
  54. Rubino F, Forgione A, Cummings DE, Vix M, Gnuli D et al. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg* 2006; 244: 741–749.
  55. Patel RT, Shukla AP, Ahn SM, Moreira M, Rubino F. Surgical control of obesity and diabetes: the role of intestinal vs. gastric mechanisms in the regulation of body weight and glucose homeostasis. *Obesity* 2014; 22: 159–169.
  56. Röder PV, Geillinger KE, Zietek TS, Thorens B, Koepsell H, Daniel H. The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PLoS One* 2014; 9: e89977.
  57. Cavin JB, Couvelard A, Lebtahi R, Ducroc R, Arapis K et al. Differences in alimentary glucose absorption and intestinal disposal of blood glucose after Roux-en-Y gastric bypass vs sleeve gastrectomy. *Gastroenterology* 2016; 150: 454–464.
  58. Saeidi N, Meoli L, Nestoridi E, Gupta NK, Kvas S et al. Reprogramming of intestinal glucose metabolism and glycemic control in rats after gastric bypass. *Science* 2013; 341: 406–410.
  59. Lozinska L, Weström B, Prykhodko O, Lindqvist A, Wierup N et al. Decreased insulin secretion and glucose clearance in exocrine pancreas - insufficient pigs. *Exp Physiol* 2016; 101: 100–112.
  60. Pierzynowski S, Goncharova K, Prykhodko O, Westrom B, Lozinska L. Enteral Pancreatic-like Enzymes of Microbial Origin affect Insulin Release during an Intravenous Glucose Tolerance Test. *J Diabetes Metab* 2016; 7:681.
  61. Alfa RW, Park S, Skelly KR, Poffenberger G, Jain N et al. Suppression of insulin production and secretion by a dectin hormone. *Cell Metab* 2015; 21: 323–333.
  62. Shen RL, Thymann T, Østergaard MV, Støy AC, Krych Ł et al. Early gradual feeding with bovine colostrum improves gut function and NEC resistance relative to infant formula in preterm pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; 309(5): G310-23.
  63. Henderson J, Daniel P, Fraser P. The pancreas as a single organ: the influence of the endocrine upon the exocrine part of the gland. *Gut* 1981; 22(2): 158-167.
  64. Jasdanwala S, Babyatsky M. A critical evaluation of serum lipase and amylase as diagnostic tests for acute pancreatitis. *Integrative Molecular Medicine* 2015; 2(3): 189-195.

KP

65. Sangild PT, Thymann T, Schmidt M, Stoll B, Burrin DG, Buddington RK. Invited review: the preterm pig as a model in pediatric gastroenterology. *J Anim Sci* 2013; 91(10): 4713-4729.
66. Pierzynowski S, Westrom B, Erlanson-Albertsson C, Ahre'n B, Svendsen J, Karlsson B. Induction of exocrine pancreas maturation at weaning in young developing pigs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 16(3): 287-293.
67. Uauy R, Mena P. Long-chain polyunsaturated fatty acids supplementation in preterm infants. *Curr Opin Pediatr* 2015; 27(2): 165-171.
68. Grassi D, Ferri L, Desideri G, Di Giosia P, Cheli P, Del Pinto R et al. Chronic hyperuricemia, uric acid deposit and cardiovascular risk. *Curr Pharma Des* 2013; 19(13): 2432-2438.
69. Roddy E. Revisiting the pathogenesis of podagra: Why does gout target the foot? *J. Foot Ankle Res* 2011; 4: 13.
70. Johnson RJ, Lanaspa MA, Gaucher EA. Uric acid: a danger signal from the RNA world that may have a role in the epidemic of obesity, metabolic syndrome and cardiorenal disease: evolutionary considerations. *Sem Nephrology* 2011; 31(5): 394-399.
71. Trifilio S, Gordon L, Singhal S, Tallman M, Evens A, Rashid K et al. Reduced-dose rasburicase recombinant xanthine oxidase in adult cancer patients with hyperuricemia. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37: 997-1001.
72. Johnson RJ, Nakagawa T, Jalal D, SaÂnchez-Lozada LG, Kang DH, Ritz E. Uric acid and chronic kidney disease: which is chasing which? *Nephrol Dial Transplant* 2013; gft029.
73. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02054091>.
74. Harada E, Araki Y, Furumura E, Takeuchi T, Sitizyo K, Yajima T et al. Characteristic transfer of colostrum-derived biologically active substances into cerebrospinal fluid via blood in natural suckling neonatal pigs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2002; 49(7): 358-364.
75. Pammi M, Weisman LE. Late-onset sepsis in preterm infants: update on strategies for therapy and prevention. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2015; 13(4): 487-504.
76. Ohlsson A, Lacy JB. Intravenous immunoglobulin for preventing infection in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 7: CD000361.

*Kateryna Pierzynowska*