

STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy

Dział Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa

Praca wykonana pod kierunkiem

Dr hab. Marka Pieszki Prof. IZ

Fizjologiczna rola zewnątrzwydzielnicza trzustki a struktura i funkcje mózgu w badaniach na modelu świni

Niewydolność zewnątrzwydzielnicza trzustki (NZT) jest główną konsekwencją chorób prowadzących do zaniku mięszu trzustki np. zapalenia trzustki, mukowiscydozy, niedrożności przewodu trzustkowego głównego lub inaktywacji enzymów trzustkowych pod wpływem kwasu solnego (zespół Zollingera-Ellisona). Ponadto, częstymi przyczynami NZT jest resekcja chirurgiczna przewodu pokarmowego i trzustkowego (np. resekcja żołądka, pankreatoduodenektomia, operacja gastric bypass). Niski poziom wydzielania enzymów trzustkowych jest obserwowany także u prosiąt, noworodków ludzkich, zarówno urodzonych w terminie jak i wcześniaków oraz u osób starszych. Nieleczony niedobór trzustkowych enzymów trawiennych może spowodować nieprawidłowe trawienie i złe wchłanianie niezbędnych składników pokarmowych, co z kolei może prowadzić do niedożywienia i utraty masy ciała u osób dorosłych oraz zaburzeń wzrostu i rozwoju osobników młodych. Konwencjonalne leczenie NZT obejmuje zastąpienie enzymów trzustkowych preparatami enzymów trzustkowych pozyskanych od świń. Pomimo wysokich dawek enzymów trzustkowych stosowanych w trakcie terapii często nie następuje normalizacja funkcji trawienia i obserwowane jest tylko częściowe zmniejszenie objawów niedożywienia.

Ostra i przewlekła niewydolność trzustki jest często związana ze znacznymi zmianami neurologicznymi dotyczącymi obniżenia funkcji poznawczych. Wielu pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki skarży się na objawy związane z obniżeniem funkcji poznawczych, takie jak depresja, zaburzenia snu. Wcześniejsze badania potwierdziły występowanie zaburzeń czynności trzustki u osób starszych. Tym samym można założyć, że niski poziom wydzielania enzymów trzustkowych jest cechą występującą zarówno u noworodków jak i osobników starszych. W obu przypadkach trzustka słabo reaguje na bodźce zewnętrzne, takie jak wydzielane w jelitach hormony z rodziny cholecystokinin (CCK) i

sekretynę odgrywające istotną rolę w procesie regulacji funkcji zewnątrzwydzielniczej trzustki. Stworzono pewną ilość różnych modeli zwierzęcych naśladujących brak aktywnych enzymów trzustkowych w jelitach. Najbardziej powszechnie stosowanymi do tych celów modelami są gryzonie (szczury, myszy) oraz świnię (zarówno miniaturowe jak i domowe). Model świński jest istotny do celów fizjologii stosowanej i medycyny, ponieważ na poziomie funkcjonalnym i rozwojowym ludzie i świnię mają wiele cech wspólnych dotyczących przewodu pokarmowego, układu moczowo-płciowego oraz rozwoju mózgu i trzustki.

W analizowanych badaniach priorytetowe znaczenie miało wskazanie możliwości zastosowania modelu świńskiego z NZT jako narzędzia eksperymentalnego naśladującego warunki osobników ludzkich z przewlekłą dysfunkcją zewnątrzwydzielniczą trzustki/braku aktywnych enzymów trzustkowych w jelitach. Spójny model zwierzęcy, umożliwiający zbadanie stanu neurologicznego takich pacjentów, mógłby posłużyć jako narzędzie o dużym potencjale do zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za zmiany neurologiczne związane z trzustką oraz korygowanie takich zmian.

Cel pracy:

Celem badań była ocena wpływu zewnątrzwydzielniczej funkcji trzustki na strukturę i funkcje mózgu na modelu świni domowej.

W tym celu sprowokowano tymczasowy brak enzymów trzustkowych w świetle jelita świń. Stosując powyższy model oceniono wpływ terapii zastępczej z wykorzystaniem enzymów trzustkowych pochodzenia mikrobiologicznego na strukturę i funkcje mózgu.

Szczegółowe cele badań:

- Ocena roli IgG w rozwoju hipokampa u nowo narodzonych świń - można tego dokonać wyłącznie u nowonarodzonych świń (kopytnych) z fizjologiczną tymczasową NZT, gdyż rodzą się one całkowicie wolne od IgG. Wszystkie IgG muszą zostać wchłonięte z jelita przed jego zamknięciem. Tak więc, w tej sytuacji możemy użyć naturalnego modelu NZT nowonarodzonych świń.
- Dostosowanie i zweryfikowanie modelu NZT u młodych świń dla podkreślenia roli egzogennej lipazy w trawieniu i późniejszym wchłanianiu tłuszczu, szczególnie kwasu dokozaheksaenowego (DHA) i kwasu arachidonowego (ARA), które są kluczowymi komponentami w trakcie formowania i rozwoju mózgu.
- Określenie roli enzymów trzustkowych obecnych w jelicie w regulacji zachowania świń.
- Ocena wpływu doświadczalnej żywności funkcjonalnej utworzonej przez zmieszanie enzymów trzustkowych pochodzenia mikrobiologicznego (PLEM) z dietą o wysokiej

zawartości tłuszczu na aktywność behawioralną oraz strukturę histomorfologiczną hipokampa w świńskim modelu z eksperymentalną NZT.

Dla realizacji wymienionych celów przeprowadzono 4 doświadczenia:

Doświadczenie 1. Prosięta podzielono na 5 grup: niessące (A), ssące (B) oraz karmione: siarą (C), dietą elementarną (ED) i ED + IgG (oczyszczone IgG w surowicy), z użyciem sondy żołądkowej, 10 ml/kg w ciągu pierwszych 24 godzin. Od 24 do 72 h wszystkie świny karmiono ED, po czym zostały uśmiercone, a mózgi wypreparowane. Hipokampalne neurony, astrocyty i komórki mikrogleju zidentyfikowano przez zastosowanie specyficznych przeciwciał i analizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego.

Wyniki: Stwierdzono pozytywne korelacje pomiędzy wzrostem, poziomem białka całkowitego i IgG w surowicy krwi a rozwojem hipokampa u prosiąt chowanych przy matce w ciągu pierwszych 3 dni po urodzeniu. U prosiąt karmionych dietą podstawową (ED) przez 24 h, zaobserwowano zmniejszoną masę ciała, niższy poziom białek w osoczu i obniżone stężenie białka specyficznego dla astrocytów w hipokampie w porównaniu do prosiąt chowanych przy matce. To ostatnie wiązało się także z obniżoną mikroglejogenezą, a co więcej ze zmniejszoną liczbą neuronów w obszarze CA1 hipokampa po 72 h. Suplementacja ED z oczyszczonymi plazmowymi Ig poprawiło glejogenezę oraz wspierało troficzny i immunologiczny status hipokampa.

Wnioski: Otrzymane wyniki wskazują, że siara oraz dieta wzbogacona w Ig pozytywnie wpływają na rozwój struktury hipokampa poprzez stymulowanie syntezy białek mózgu i jego rozwoju we wczesnym okresie poporodowym. Należy zaznaczyć, że niskie wydzielanie enzymów trzustki oraz ich naturalna inhibicja przez inhibitory trzustki i siary chronią IgG przed strawieniem i tym samym pozwalają na absorpcję IgG w pierwszych godzinach po porodzie.

Doświadczenie 2. Trzydzieści prosiąt z NZT zostało losowo podzielonych na 3 grupy: L1 (n = 5) karmione preparatem dla niemowląt wzbogaconym o lipazę 1; Grupa L2 (n = 4) karmione preparatem dla niemowląt wzbogaconym o lipazę 2; Grupa kontrolna (n = 4) otrzymująca tylko preparat dla niemowląt. Badania składały się z okresu wstępnego, adaptacyjnego, kontrolnego oraz doświadczalnego (1 tydzień każdy). Oceny poprawy wchłaniania tłuszczu dokonano na podstawie parametrów lipidów krwi (współczynnika wchłaniania tłuszczu, poziomu nieestryfikowanych kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli).

Wyniki: Trawienie i absorpcja tłuszczu były ściśle powiązane z suplementacją lipazami w mieszance dla niemowląt, czego dowodem mogą być zmniejszona ilość tłuszczu w kale u świń karmionych preparatem wzbogaconym enzymami, zwiększony współczynnik wchłaniania tłuszczu (CFA), zwiększone wartości dla indeksu lipemicznego (LI) nieestryfikowanych kwasów tłuszczowych (NEFA) i triglicerydów (TG) we krwi, które były porównywalne z wartościami dla noworodków karmionych piersią. Nie odnotowano istotnego zmniejszenia spożycia preparatu dla niemowląt suplementowanego lipazami przez prosięta z NZT w wyniku zmniejszenia apetytu. Podczas okresu doświadczalnego brak podstawowych enzymów trzustkowych np. proteazy i amylazy w przewodzie pokarmowym prosiąt z NZT pozostał bez istotnego wpływu na przyrosty masy ciała. Obserwacja ta przypomina powolny wzrost karmionych piersią niemowląt urodzonych w terminie oraz wcześniaków.

Wnioski: U prosiąt z NZT karmionych preparatem dla niemowląt stosowanym w niniejszym badaniu procesy takie jak wzrost oraz trawienie i absorpcja lipidów w dużej mierze przypominają te zachodzące u noworodków ludzkich. Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że egzogenne lipazy mogą być wykorzystane do poprawy trawienia i wchłaniania lipidów u nowo narodzonych dzieci, w tym także wcześniaków, a także potwierdzają racjonalność stosowania opisanego świńskiego modelu NZT do badania trawienia, wchłaniania i metabolizmu u niemowląt.

Doświadczenie 3. Do oceny wpływu enzymatycznej suplementacji diety podstawowej (3% tłuszczu) zastosowano randomizowane badanie krzyżowe. Po 6 tygodniach rekonwalescencji rozpoczęto badania uwzględniając 2 okresy kontrolne i 2 doświadczalne z suplementacją enzymem, po 10 dni każdy. W dniu 7 i 10 każdego okresu monitorowano zachowanie w trakcie 24h, a także odnotowywano zużycie paszy i masy ciała. Obserwacje behawioralne dotyczyły pozycji świń: leżąca/pasywna, siedząca lub stojąca/aktywna i były wyrażone jako procent aktywności w ciągu 24 h.

Wyniki: Wzrost ciała był całkowicie zahamowany w czasie rekonwalescencji, podczas gdy w trakcie realizacji badania średnia masa ciała świń zwiększyła się z $10,5 \pm 1,1$ do $14,0 \pm 1,4$ kg ($p < 0,01$), pomimo że enzym był podawany tylko co drugi tydzień. Co istotne, okazało się, że świny z NZT były bardziej aktywne, kiedy były karmione enzymami mikrobiologicznymi (19%/24h) w porównaniu do diety kontrolnej (16%/24h, $p < 0,01$).

Wnioski: Suplementacja enzymami mikrobiologicznymi pozytywnie wpłynęła na wzrost świń z NZT, a także zwiększyła ich aktywność. Takie zachowanie jest sprzeczne z ogólnie przyjętą normą, zgodnie z którą sytość zmniejsza ruchliwość ludzi lub zwierząt.

Doświadczenie 4. Badanie przeprowadzono na 12 knurkach otrzymujących dietę wysokotłuszczową (18%). NZT została wywołana sztucznie poprzez podwiązanie przewodu trzustkowego. Poziom kwaśnego białka włóknikowego (GFAP), S100B oraz cząsteczki przylegania komórek nerwowych (NCAM) mierzono przy pomocy testu ELISA. Celem oceny morfologii mózgu przeprowadzono potrójne immunowybarwienie hipokampa. Zdjęcia tkanki hipokampa były analizowane z zastosowaniem mikroskopu konfokalnego. Monitorowanie zachowania przeprowadzono przy użyciu programu MSH-Video.

Wyniki: NZT prowadzi do zmniejszenia ilości piramidalnych neuronów w obszarze CA1 hipokampa (do 50%) i zmniejszenia poziomu rozpuszczalnych i błonowych form cząsteczek przylegania komórek nerwowych (NCAM). Zmniejszonej ilości astrocytów w analizowanym obszarze hipokampa towarzyszył zmniejszony poziom filamentowego GFAP (54,36 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ tkanki) w porównaniu do knurków kontrolnych (64,01 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ tkanki) i zwiększony poziom rozpuszczalnego GFAP (120%), wyizolowanego z lewego i prawego hipokampa świń z NZT. Jednakże suplementacja enzymami trzustkowymi pochodzenia mikrobiologicznego (PLEM) przez 10 dni przywróciła parametry histomorfologiczne hipokampa i aktywność behawioralną świń z NZT.

Wnioski: Niniejsze doświadczenie dowodzi, że eksperymentalna zewnątrzwydzielnicza niewydolność trzustki (NZT) u młodych świń wywołuje zmiany w zachowaniu zwierząt (do 33%), a także zmiany zwyrodnieniowe w obrębie struktur histomorfologicznych hipokampa. Co więcej, udowodniono, że żywność funkcjonalna uzyskana dzięki suplementacji diety PLEM przywraca fizjologiczne zachowanie i histomorfologię hipokampa u świń NZT w ciągu 10 dni. Tak więc, proponujemy PLEM jako funkcjonalny składnik żywności mogący zapobiec lub odroczyć związane z NZT zmiany neurodegeneracyjne.

Podsumowanie i wnioski

1. Dieta prosiąt wzbogacona w IgG pozytywnie wpływała na rozwój struktury hipokampa poprzez stymulowanie syntezy białek mózgu i jego rozwoju we wczesnym okresie postnatalnym.
2. Egzogenne lipazy mogą być wykorzystane do poprawy trawienia i wchłaniania lipidów u nowo narodzonych dzieci, w tym także wcześniaków, a także potwierdzają racjonalność

stosowania opisanego świńskiego modelu NZT do badania trawienia, wchłaniania i metabolizmu u niemowląt.

3. Wzbogacenie standardowej diety świń w PLEM i tłuszcz, do poziomu 18% pozytywnie wpływała na wzrost świń z NZT, wywierając istotny wpływ na budowę i funkcję mózgu oraz aktywność behawioralną zwierząt.
4. Niewydolność wydzielnicza trzustki powodowała zmiany zwyrodnieniowe w obrębie struktur histomorfologicznych hipokampa.

Kraków, 9.10.2015 r.