

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY w LUBLINIE

Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Dyscyplina naukowa Weterynaria

lek. wet. Jadwiga Śliwa

Rozprawa doktorska

**Ekspresja i immunolokalizacja wybranych hormonów komórek enteroendokrynnych
oraz morfometria jelita czczego świni w modelu przewlekłego zapalenia trzustki**

***Expression and Immunolocalization of Selected Enteroendocrine Cell Hormones and
Jejunal Morphometry in a Porcine Model of Chronic Pancreatitis***

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Anatomii i Histologii Zwierząt
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w
Lublinie

Promotor: prof. dr hab. Marcin Arciszewski

Lublin, 2026

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 02/06/2026

Podpis promotora *Flawia Furmanek*

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/Promoterów/Promotora-pomoenniczego* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie-CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data 02/06/2026

Podpis autora *Yedago Sine*

* niepotrzebne skreślić

Pragnę serdecznie podziękować mojemu **Promotorowi, Panu Profesorowi Marcinowi Arciszewskiemu**, za cenne wskazówki, życzliwość, wsparcie merytoryczne oraz pomoc na wszystkich etapach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej.

Szczególne podziękowania kieruję do wszystkich współpracowników i członków zespołu badawczego za pomoc w prowadzeniu doświadczeń, wykonywaniu analiz oraz za inspirujące dyskusje naukowe.

Dziękuję również pracownikom technicznym za wsparcie organizacyjne oraz pomoc w realizacji badań.

Najserdeczniejsze podziękowania składam mojej Rodzinie za cierpliwość, wyrozumiałość, nieustanne wsparcie i motywację, które pozwoliły mi doprowadzić tę pracę do końca.

Szczególne podziękowania kieruję do mojego Męża za nieustanne wsparcie, cierpliwość, wyrozumiałość oraz motywację okazywane podczas całego okresu realizacji badań i przygotowywania rozprawy. Jego obecność, pomoc i wiara w powodzenie tej pracy były dla mnie nieocenionym źródłem siły w chwilach zwątpienia i zmęczenia.

Streszczenie

Przewlekłe zapalenie trzustki (PZT) jest postępującą chorobą zapalną prowadzącą do przebudowy miększu trzustki, zaburzeń funkcji zewnątrzwydzielniczej oraz licznych następstw pozatrzustkowych. Coraz więcej danych wskazuje, że jednym z narządów wtórnie zaangażowanych w przebieg PZT jest jelito cienkie, jednak mechanizmy odpowiedzialne za zmiany zachodzące w jego ścianie pozostają słabo poznane, szczególnie w modelach dużych zwierząt. Celem pracy było określenie wpływu przewlekłego zapalenia trzustki indukowanego ceruleiną na morfometrię ściany jelita czczego, populację komórek enteroendokrynnych oraz organizację jelitowego układu nerwowego u świń.

Materiał badawczy stanowiły tkanki pobrane od młodych, 10-tygodniowych, niekastrowanych samców świni domowej (*Sus scrofa domestica*), przydzielonych do grupy kontrolnej lub grupy z przewlekłym zapaleniem trzustki indukowanym wielokrotnym podawaniem ceruleiny (n = 5 w każdej grupie). Oceniono ekspresję wybranych genów metodą RT-qPCR, przeprowadzono badania immunohistochemiczne komórek GIP- i GLP-1-immunoreaktywnych, wykonano analizę histologiczną i histomorfometryczną ściany jelita czczego oraz ocenę struktur jelitowego układu nerwowego.

Przewlekłe zapalenie trzustki prowadziło do istotnego spadku masy ciała zwierząt. W ścianie jelita czczego stwierdzono selektywną przebudowę warstw głębokich, obejmującą zmniejszenie grubości warstwy okrężnej i podłużnej mięśniówki oraz podśluzówki, przy zachowaniu całkowitej grubości błony śluzowej. Jednocześnie obserwowano skrócenie krypt jelitowych, tendencję do wydłużenia kosmków oraz zwiększenie liczby komórek kubkowych, wskazujące na przebudowę architektury nabłonka i aktywację mechanizmów ochronnych bariery śluzowej.

Analiza molekularna wykazała istotny spadek ekspresji *GIP* oraz wzrost ekspresji *GCG*, *NPY* i *FABP2*, a także tendencję do zwiększonej ekspresji *IL10*. W badaniu immunohistochemicznym nie stwierdzono zmian liczby komórek GIP-immunoreaktywnych, natomiast liczba komórek GLP-1-immunoreaktywnych wzrosła ponad dwukrotnie zarówno w kosmkach, jak i kryptach jelitowych. Nie wykazano zmian w ekspresji receptorów inkretynowych. Uzyskane wyniki wskazują na przeprogramowanie lokalnej osi enteroendokrynną z przesunięciem równowagi od sygnalizacji GIP do osi proglukagonowej.

W obrębie jelitowego układu nerwowego wykazano wzrost pola powierzchni zwojów mięśniowych przy braku zmian liczby neuronów oraz parametrów zwojów podśluzówkowych. Wyniki te świadczą o selektywnym remodelingu komponentu neuromięśniowego jelita, prawdopodobnie związanym z procesami neuroplastycznymi i adaptacją do przewlekłego stanu zapalnego.

Uzyskane wyniki wskazują, że przewlekłe zapalenie trzustki indukowane ceruleiną wywołuje złożoną przebudowę jelita czczego obejmującą komponent strukturalny, enteroendokrynną, barierową i neurogenną. Obserwowany fenotyp ma charakter mieszany, ponieważ współistnieją w nim cechy degeneracyjne, związane głównie z zanikiem warstw mięśniowych i utratą masy ciała, oraz cechy adaptacyjne obejmujące aktywację osi proglukagonowej, wzrost liczby komórek kubkowych oraz przebudowę struktur ENS. Wyniki pracy wskazują, że jelito czcze stanowi aktywny element osi trzustka-jelito i uczestniczy w wielopoziomowej odpowiedzi organizmu na przewlekłe zapalenie trzustki.

Summary

Chronic pancreatitis (CP) is a progressive inflammatory disease characterized by pancreatic parenchymal remodeling, impaired exocrine function, and numerous extrapancreatic consequences. Increasing evidence suggests that the small intestine is one of the secondary organs affected during the course of CP; however, the mechanisms underlying intestinal wall alterations remain poorly understood, particularly in large-animal models. The aim of this study was to determine the effects of cerulein-induced chronic pancreatitis on the morphometry of the jejunal wall, enteroendocrine cell populations, and the organization of the enteric nervous system (ENS) in pigs.

The study was conducted on tissues collected from young, 10-week-old intact male pigs (*Sus scrofa domestica*) assigned either to a control group or to a chronic pancreatitis group induced by repeated administration of cerulein (n = 5 per group). The expression of selected genes was analyzed using RT-qPCR. Immunohistochemical evaluation of GIP- and GLP-1-immunoreactive cells was performed, together with histological and histomorphometric analyses of the jejunal wall and assessment of enteric nervous system structures.

Chronic pancreatitis resulted in a significant reduction in body weight. Histomorphometric analysis revealed selective remodeling of the deeper layers of the jejunal wall, including reduced thickness of the circular and longitudinal muscle layers as well as the submucosa, while the overall mucosal thickness remained unchanged. In addition, intestinal crypts were shortened, villi tended to be longer, and goblet cell numbers were increased, indicating epithelial remodeling and activation of protective mucosal barrier mechanisms.

Molecular analysis demonstrated a significant decrease in *GIP* expression and increased expression of *GCG*, *NPY*, and *FABP2*, together with a tendency toward increased *IL10* expression. Immunohistochemical analysis showed no changes in the number of GIP-immunoreactive cells, whereas the number of GLP-1-immunoreactive cells more than doubled in both villi and intestinal crypts. No differences were observed in the expression of incretin receptors. These findings indicate a reprogramming of the local enteroendocrine axis, characterized by a shift from GIP-related signaling toward activation of the proglucagon axis.

Within the ENS, the area of myenteric plexuses was significantly increased, whereas neuronal numbers and the parameters of submucosal plexuses remained unchanged. These findings

suggest selective remodeling of the neuromuscular component of the intestine, likely associated with neuroplastic adaptations to chronic inflammation.

In conclusion, cerulein-induced chronic pancreatitis triggered complex remodeling of the porcine jejunum involving structural, enteroendocrine, barrier-related, and neurogenic components. The observed phenotype exhibited both degenerative features, mainly associated with muscular atrophy and body weight loss, and adaptive responses, including activation of the proglucagon axis, increased goblet cell abundance, and ENS remodeling. These findings indicate that the jejunum is an active component of the pancreas-gut axis and participates in the multifaceted systemic response to chronic pancreatitis.

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ SYMBOLI I OZNACZEŃ	8
2. WPROWADZENIE.....	9
1. ZARYS BUDOWY PRZEWODU POKARMOWEGO ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM JELITA CIENKIEGO	9
2. ŚWINIA JAKO MODEL W BADANIACH LABORATORYJNYCH.....	19
3. ZAPALENIE TRZUSTKI INDUKOWANE CERULEINĄ W BADANIACH MODELOWYCH.....	20
3. PROBLEM BADAWCZY	25
4. HIPOTEZA PRACY	26
5. CEL PRACY	27
6. MATERIAŁ I METODY	28
1. SCHEMAT DOŚWIADCZENIA	28
2. PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADAŃ	29
3. ANALIZA qPCR.....	29
4. BARWIENIA PREPARATÓW I REAKCJA IMMUNOHISTOCHEMICZNA.....	32
5. ANALIZA HISTOMORFOMETRYCZNA	34
6. ANALIZA STATYSTYCZNA	39
7. WYNIKI.....	40
1. MASY CIAŁA.....	40
2. EKSPRESJA GENÓW	41
3. KOMÓRKI IMMUNOREAKTYWNE.....	42
4. HISTOMORFOMETRIA ŚCIANY JELITA CZCZEGO	45
5. ZWOJE MIĘŚNIOWE I PODŚLUZÓWKOWE UKŁADU NERWOWEGO JELITOWEGO.....	48
8. DYSKUSJA.....	51

6.	OGRANICZENIA, TRANSLACYJNOŚĆ I KIERUNKI DALSZYCH BADAŃ	63
9.	WNIOSKI	68
10.	BIBLIOGRAFIA	69
11.	SPIS RYCIN	96
12.	SPIS TABEL	98

1. WYKAZ SYMBOLI I OZNACZEŃ

5-HT	serotonina
cAMP	cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan
CCK	cholecystokinina
CgA	chromogranina A
ChAT	cholinoacetylotransferaza
ENS	układ nerwowy jelitowy (ang. <i>enteric nervous system</i>)
EPI	zewnątrzwydzielnicza niewydolność trzustki
FC	krotność zmiany (ang. <i>fold change</i>)
GIP	glukozozależny peptyd insulintropowy
GIPR	receptor GIP
GIT	przewód pokarmowy (ang. <i>gastrointestinal tract</i>)
GLP-1	peptyd glukagonopodobny 1
GLP1-R	receptor peptydu glukagonopodobnego typu 1
GLP-2	peptyd glukagonopodobny 2
GSE	geometryczny błąd standardowy
IL	interleukina
IL-10	interleukina 10
mRNA	informacyjne RNA
NF-kB	czynn timer jądrowy kappa B
nNOS	neuronalna syntaza tlenu azotu
NO	Tlenek azotu
NPY	neuropeptyd Y
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy
PKA	kinaza białkowa A (ang. <i>protein kinase A</i>)
PYY	peptyd YY
PZT	przewlekłe zapalenie trzustki
qPCR	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>quantitative PCR</i>)
RQ	względny poziom ekspresji
SIBO	zespół rozrostu bakteryjnego jelita cienkiego
SSTR	receptor somatostatyny
TLR4	receptor toll-podobny 4 (ang. <i>toll-like receptor 4</i>)
TNF-alfa	czynn timer martwicy nowotworów alfa
VIP	naczynioaktywny peptyd jelitowy

2. WPROWADZENIE

1. ZARYS BUDOWY PRZEWODU POKARMOWEGO ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM JELITA CIENKIEGO

Układ pokarmowy składa się z przewodu pokarmowego (GIT, gastrointestinal tract) oraz związanych z nim gruczołów trawiennych. Jego podstawową funkcją jest pobieranie, trawienie i wchłanianie składników odżywczych, witamin, składników mineralnych oraz wody. Procesy te podlegają złożonej regulacji nerwowej i hormonalnej.

Z anatomicznego punktu widzenia przewód pokarmowy stanowi ciągłą strukturę rurową, wykazującą miejscowe rozszerzenia oraz wyspecjalizowane odcinki o odmiennej budowie i funkcji. Rozpoczyna się jamą ustną, a kończy odbytem. Poszczególne odcinki przewodu pokarmowego obejmują kolejno: jamę ustną, gardło, przełyk, przedżołądki (jeżeli występują), żołądek, jelito cienkie oraz jelito grube. Jelito cienkie dzieli się na dwunastnicę, jelito czcze i jelito kręte, natomiast jelito grube obejmuje jelito ślepe, okrężnicę oraz odbytnicę. Funkcję przewodu pokarmowego wspomagają narządy gruczołowe związane z procesami trawienia, takie jak ślinianki, wątroba i trzustka. Wydzieliny tych narządów, odpowiednio ślina, żółć oraz sok trzustkowy, odgrywają kluczową rolę w procesach trawienia i wchłaniania składników pokarmowych (König & Liebich, 2020).

Długość przewodu pokarmowego oraz stopień jego specjalizacji są związane z rodzajem pobieranego pokarmu. U zwierząt roślinożernych oraz wszystkożernych przewód pokarmowy jest zwykle dłuższy, co umożliwia efektywne wykorzystanie pasz bogatych w błonnik i składniki trudniej ulegające trawieniu, takie jak celuloza. U zwierząt mięsożernych przewód pokarmowy jest zazwyczaj krótszy, co odzwierciedla odmienny charakter pobieranego pokarmu (Reece & Rowe, 2017).

Jelito cienkie rozpoczyna się przy odźwierniku żołądka, a kończy w miejscu połączenia z jelitem ślepym. W klasycznym podziale anatomicznym składa się z trzech odcinków: dwunastnicy, jelita czczego oraz jelita krętego. Dwunastnica stanowi pierwszy odcinek jelita cienkiego i jest bezpośrednio połączona z żołądkiem. Do jej początkowego odcinka uchodzą przewody wyprowadzające wątroby i trzustki, doprowadzające odpowiednio żółć oraz sok trzustkowy. U poszczególnych gatunków zwierząt występują różnice anatomiczne w budowie i przebiegu przewodów żółciowych oraz trzustkowych. Przykładowo u świń i bydła przewody

te uchodzą do dwunastnicy oddzielnie, natomiast u psów i owiec mogą łączyć się przed wejściem do jelita (Truty & Smoot, 2008).

Jelito czcze stanowi środkowy i najdłuższy odcinek jelita cienkiego. Tworzy liczne pętle jelitowe zawieszone na krezce i odpowiada za większość procesów wchłaniania składników pokarmowych. Jelito kręte stanowi końcowy odcinek jelita cienkiego i przechodzi w jelito ślepe. Granica pomiędzy jelitem czczym a krętym nie jest zwykle wyraźnie zaznaczona makroskopowo i ma charakter umowny.

Budowa histologiczna. Histologicznie ściana przewodu pokarmowego wykazuje zróżnicowanie zależne od analizowanego odcinka, jednak zasadniczo można w niej wyróżnić cztery podstawowe warstwy: błonę śluzową, błonę podśluzową, błonę mięśniową oraz błonę surowiczą, wymieniane kolejno od światła przewodu pokarmowego ku jego powierzchni zewnętrznej (Reece & Rowe, 2017).

Błona śluzowa wyściela światło przewodu pokarmowego i stanowi pierwszą barierę kontaktu pomiędzy organizmem a treścią pokarmową. W poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego tworzy ona charakterystyczne fałdy, a w jelicie cienkim dodatkowo kosmki jelitowe, których powierzchnia pokryta jest przez enterocyty wyposażone w mikrokosmki. Takie ukształtowanie śluzówki znacząco zwiększa powierzchnię wchłaniania. Błona podśluzowa zbudowana jest z tkanki łącznej luźnej zawierającej naczynia krwionośne, naczynia limfatyczne oraz elementy układu nerwowego. W dwunastnicy występują ponadto gruczoły Brunnera produkujące zasadową wydzielinę uczestniczącą w neutralizacji kwaśnej treści żołądkowej. W obrębie błony podśluzowej znajduje się również splot podśluzówkowy (Meissnera), którego neurony uczestniczą w regulacji procesów wydzielania i wchłaniania (Costa i in., 2000).

Błona mięśniowa stanowi najbardziej zróżnicowaną warstwę ściany przewodu pokarmowego. W początkowych odcinkach przewodu pokarmowego może być zbudowana z mięśni poprzecznie prążkowanych, natomiast w dalszych odcinkach dominuje mięśniówka gładka. W większości odcinków przewodu pokarmowego tworzą ją dwie warstwy: wewnętrzna okrężna oraz zewnętrzna podłużna. Wyjątek stanowi żołądek, w którym występuje dodatkowa warstwa skośna. Między warstwami mięśniowymi zlokalizowany jest splot mięśniowy (Auerbacha), odpowiedzialny za koordynację motoryki przewodu pokarmowego.

Najbardziej zewnętrzną warstwę stanowi błona surowicza. W obrębie jelita cienkiego i większości jelita grubego przechodzi ona w kreskę, która stabilizuje położenie jelit w jamie brzusznej. Za pośrednictwem kreski do ściany jelita docierają naczynia krwionośne, naczynia chłonne oraz włókna nerwowe (Kobryń & Kobryńczuk, 2012; Zimmerman i in., 2019).

W jelicie cienkim zachodzą intensywne procesy trawienia i wchłaniania składników pokarmowych. Przystosowaniem morfologicznym do pełnienia tych funkcji jest znaczne zwiększenie powierzchni chłonnej dzięki obecności fałdów okrężnych, kosmków jelitowych oraz mikrokosmków enterocytów. W obrębie kosmków znajdują się naczynia krwionośne, naczynia limfatyczne, włókna mięśniowe gładkie oraz elementy unerwienia. Kosmki pokryte są jednowarstwowym nabłonkiem walcowatym, którego dominującym typem komórek są enterocyty. Na ich powierzchni szczytowej obecne są mikrokosmki tworzące rąbek prążkowany. Sąsiadujące enterocyty połączone są kompleksami połączeń międzykomórkowych, w tym połączeniami ścisłymi (tight junctions), które ograniczają przenikanie substancji pomiędzy komórkami i uczestniczą w utrzymaniu integralności bariery jelitowej. Enterocyty charakteryzują się wysoką aktywnością proliferacyjną i są stale odnawiane przez komórki macierzyste zlokalizowane w kryptach jelitowych. Pomiedzy enterocytami występują komórki kubkowe odpowiedzialne za syntezę i wydzielanie śluzu. Błona śluzowa oraz podśluzowa zawierają również gruczoły ścienne produkujące składniki wydzieliny śluzowej pokrywającej powierzchnię nabłonka. W obrębie jelita krętego występują ponadto skupiska tkanki limfatycznej tworzące grudki i kępki chłonne, stanowiące ważny element jelitowego układu odpornościowego (Banks, 1993).

Układ enteroendokryny. Rozproszony układ enteroendokryny tworzą wyspecjalizowane komórki enteroendokryne rozmieszczone w nabłonku przewodu pokarmowego, występujące zarówno w żołądku, jelicie cienkim i grubym, jak również w obrębie trzustki (Sternini i in., 2008). Komórki enteroendokryne jelita cienkiego syntetyzują i wydzielają liczne hormony peptydowe, które uczestniczą w regulacji funkcji przewodu pokarmowego oraz procesów metabolicznych zachodzących poza nim. Wiele hormonów enteroendokrynych wykazuje pleiotropowe działanie, a poszczególne funkcje fizjologiczne pozostają pod kontrolą kilku wzajemnie oddziałujących szlaków hormonalnych. Dzięki temu układ enteroendokryny odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu.

Komórki enteroendokryne uczestniczą w regulacji procesów trawienia, wydzielania hormonów trzustkowych, kontroli apetytu, motoryki przewodu pokarmowego oraz gospodarki

energetycznej organizmu. Jednocześnie pełnią funkcję wyspecjalizowanych komórek sensorycznych zdolnych do wykrywania składników odżywczych obecnych w świetle jelita i dostosowywania procesów trawienia oraz wchłaniania do aktualnego składu treści pokarmowej. W odpowiedzi na bodźce luminalne wydzielane hormony mogą działać endokrynnie po uwolnieniu do krwiobiegu lub miejscowo, poprzez mechanizmy parakrynnie i neurokrynnie, oddziałując na komórki nabłonka oraz zakończenia nerwowe obecne w ścianie jelita (Latorre i in., 2016). Coraz więcej danych wskazuje również, że komórki enteroendokrynnie uczestniczą w bezpośredniej komunikacji z neuronami jelitowymi i włóknami nerwu błędnego, stanowiąc istotny element osi jelito-mózg (Liddle, 2019).

Pomimo że komórki enteroendokrynnie stanowią jedynie około 1% komórek nabłonka jelitowego, są najliczniejszą populacją komórek endokrynnych organizmu i produkują ponad 20 różnych hormonów oraz neuropeptydów (Hooper, 2015). Szczególne znaczenie dla regulacji funkcji przewodu pokarmowego i metabolizmu mają komórki K wydzielające peptyd insulinotropowy zależny od glukozy (GIP) oraz komórki L produkujące peptydy pochodzące z proglukagonu, w tym glukagonopodobny peptyd 1 (GLP-1) i glukagonopodobny peptyd 2 (GLP-2).

Obecnie uważa się, że komórki enteroendokrynnie pełnią funkcję nie tylko sensorów składników odżywczych, lecz także uczestniczą w monitorowaniu środowiska mikrobiologicznego jelita. Coraz więcej danych wskazuje, że mogą one rozpoznawać sygnały pochodzenia bakteryjnego za pośrednictwem receptorów rozpoznających wzorce molekularne, w tym receptorów Toll-podobnych (TLR), zwłaszcza TLR4, a także receptorów reagujących na metabolity wytwarzane przez bakterie komensalne (Furness i in., 2013). W odpowiedzi na te bodźce komórki enteroendokrynnie mogą wydelać hormony, neuropeptydy oraz cytokiny oddziałujące na komórki odpornościowe, podczas gdy komórki układu immunologicznego, wyposażone w receptory dla wielu hormonów peptydowych, mogą modulować lokalną odpowiedź zapalną i funkcje bariery jelitowej.

W jelicie cienkim klasycznie wyróżnia się populacje komórek enteroendokrynnych określane jako komórki L, D, I, K, N, S oraz komórki enterochromafinowe. Poszczególne populacje różnią się profilem wydzielanych hormonów i zakresem pełnionych funkcji fizjologicznych. Współczesne badania wskazują jednak, że podział ten ma charakter uproszczony, ponieważ komórki enteroendokrynnie wykazują znaczną plastyczność fenotypową, a pojedyncze komórki mogą syntetyzować więcej niż jeden hormon. Ponadto

skład i aktywność populacji enteroendokrynnych mogą ulegać zmianom adaptacyjnym pod wpływem czynników żywieniowych, mikrobiologicznych, metabolicznych oraz zapalnych.

Komórki enterochromafinowe. Komórki enterochromafinowe są najliczniejszą populacją komórek enteroendokrynnych przewodu pokarmowego ssaków i występują w żołądku, dwunastnicy oraz jelicie cienkim i grubym. Ich nazwa pochodzi od zdolności do wiązania soli chromu. Głównym produktem wydzielniczym komórek enterochromafinowych jest serotonina (5-HT), powstająca w wyniku hydroksylacji i dekarboksylacji tryptofanu (Ahlman & Nilsson, 2001). Komórki enterochromafinowe osiągają wielkość około 8 μm i mają zazwyczaj kształt trójkątny lub piramidalny (Modlin i in., 2006). Większość z nich reprezentuje typ „otwarty”, charakteryzujący się obecnością apikalnych wypustek cytoplazmatycznych sięgających światła gruczołu i zakończonych krótkimi mikrokosmkami, co umożliwia bezpośrednie reagowanie na bodźce fizyczne i chemiczne obecne w świetle jelita. Pęcherzyki wydzielnicze występują zarówno w części szczytowej, jak i podstawnej komórek enterochromafinowych (Spiller, 2008). Zawarta w nich 5-HT magazynowana jest z udziałem pęcherzykowego transportera monoamin (Hayashi i in., 1999).

Badania immunohistochemiczne wykazały obecność chromograniny A (CgA), początkowo uznawanej za marker komórek enterochromafinowych, we wszystkich odcinkach przewodu pokarmowego (Portela-Gomes i in., 1997). Jednak seria badań dotyczących kolokalizacji CgA z hormonami enteroendokrynnymi w błonie śluzowej okrężnicy wykazała, że białko to współwystępuje nie tylko z 5-HT, lecz również z peptydem YY (PYY) oraz enteroglukagonem, które nie są produktami komórek enterochromafinowych (Portela-Gomes i in., 1997). Ogranicza to zastosowanie CgA jako swoistego markera komórek enterochromafinowych, dlatego obecnie jest ona częściej wykorzystywana jako ogólny marker komórek enteroendokrynnych.

Około 95% całkowitej ilości serotoniny w organizmie znajduje się w przewodzie pokarmowym, a jej głównym magazynem są ziarnistości wydzielnicze komórek enterochromafinowych (Spiller, 2008). Uwalnianie 5-HT przez te komórki jest częściowo regulowane przez lokalne mechanizmy neurokrynnie i parakrynnie, co potwierdzono w badaniach eksperymentalnych na zwierzętach (Ferrara i in., 1987).

W badaniach czynnościowych wykazano, że obecność treści jelitowej stymuluje wydzielanie 5-HT w jelicie człowieka (Kellum i in., 1999). Mechanizmy odpowiedzialne za ten efekt obejmują zarówno bezpośrednie, mechanicznie indukowane uwalnianie serotoniny z

komórek enterochromafinowych, jak i pośrednie mechanizmy związane z aktywacją neuronalnych szlaków aferentnych. Wykazano również, że uwalnianie 5-HT może następować w odpowiedzi na bodźce chemiczne obecne w świetle jelita. Potwierdzają to badania wykazujące obecność receptorów smakowych i węchowych w komórkach enterochromafinowych (Braun i in., 2007; Modlin i in., 2006), jak również doświadczenia, w których obserwowano uwalnianie 5-HT po dodaniu różnych substancji smakowych do hodowli komórkowych (Kidd i in., 2008).

Dodatkowo badania na zwierzętach wykazały istnienie interakcji pomiędzy limfocytami T a komórkami enterochromafinowymi. Liczba tych komórek była zmniejszona zarówno u myszy pozbawionych receptora limfocytów T, jak i u myszy z ciężkim złożonym niedoborem odporności, co wskazuje na potencjalny udział komórek enterochromafinowych w regulacji odpowiedzi immunologicznej (Spiller, 2008).

Działanie biologiczne wydzielonej serotoniny jest regulowane przez siedem rodzin receptorów 5-HT, które są rozmieszczone na różnych typach komórek jelita cienkiego, w tym na neuronach jelitowego układu nerwowego (ENS, enteric nervous system) oraz na samych komórkach enterochromafinowych (Holbrook i in., 2009). Wynika to częściowo z faktu, że 5-HT wydzielana przez komórki enterochromafinowe działa nie tylko w sposób endokrynnny, lecz także autokrynnny, parakrynnny i neurokrynnny. Badania przeprowadzone zarówno na zwierzętach, jak i u ludzi wykazały, że 5-HT nasila motorykę jelit i przyspiesza pasaż jelitowy (Coleman i in., 2003). Serotonina wpływa na motorykę przewodu pokarmowego również poprzez bezpośrednie oddziaływanie na mięśnie gładkie, wywołując przede wszystkim ich relaksację (Björnsson i in., 2002), jednak za efekt ten częściowo odpowiada także dwukierunkowa interakcja pomiędzy komórkami enterochromafinowymi a ENS. Po uwolnieniu z komórek enterochromafinowych 5-HT wiąże się z receptorami 5-HT₄ obecnymi na zakończeniach nerwowych pierwotnych wewnątrzpochodnych neuronów aferentnych (IPAN), co prowadzi do aktywacji neuronów cholinergicznnych unerwiających mięśnie gładkie jelita cienkiego (Galligan, 2017). Ponieważ u pacjentów z zespołem jelita drażliwego z dominującym zaparciem obserwowano zmniejszoną liczbę komórek enterochromafinowych wykazujących ekspresję receptorów 5-HT₄ i 5-HT_{2A}, uważa się, że komórki te mogą odgrywać istotną rolę w patofizjologii tego zaburzenia (Dunlop i in., 2005).

Enteroendokrynnne komórki L występują we wszystkich odcinkach jelita cienkiego. Są to komórki o charakterystycznym, najczęściej butelkowatym kształcie, często zlokalizowane w

obrębie krypt nabłonka jelitowego. Badania immunohistochemiczne wykazały, że produkują one peptyd YY (PYY) oraz proglukagon, który po obróbce potranslacyjnej stanowi prekursor glicentyny, oksyntomoduliny, peptydu glukagonopodobnego 1 (GLP-1) oraz peptydu glukagonopodobnego 2 (GLP-2) (Drucker & Nauck, 2006). Peptyd YY jest syntetyzowany w tych samych odcinkach przewodu pokarmowego co oksyntomodulina i uczestniczy w regulacji sytości, hamowaniu opróżniania żołądka, ograniczaniu wydzielania kwasu solnego oraz utrzymaniu homeostazy wodno-elektrolitowej organizmu (Gribble i in., 2018). GLP-1 hamuje wydzielanie glukagonu, opóźnia opróżnianie żołądka, wpływa na funkcję zewnątrzwydzielniczą trzustki oraz uczestniczy w regulacji metabolizmu glukozy (Smits i in., 2016). GLP-2 jest produkowany przez komórki L w tych samych obszarach przewodu pokarmowego co GLP-1 i wykazuje działanie intestinotroficzne, uczestnicząc w procesach wzrostu, regeneracji oraz utrzymania integralności błony śluzowej jelita (El-Jamal i in., 2014). Uważa się natomiast, że oksyntomodulina, produkowana głównie w jelicie czczym, jelicie krętym i okrężnicy, uczestniczy w regulacji bilansu energetycznego oraz homeostazy masy ciała (Wynne i in., 2010). Chociaż fizjologiczna rola glicentyny, zawierającej sekwencję oksyntomoduliny z końcem N-terminalnym, nie została dotychczas jednoznacznie określona, a jej receptor pozostaje nieznany, dostępne dane wskazują, że może ona uczestniczyć w regulacji wydzielania insuliny, motoryki przewodu pokarmowego oraz procesów wzrostu i regeneracji nabłonka jelitowego (Perakakis & Mantzoros, 2020). Oksyntomodulina wykazuje większość efektów biologicznych przypisywanych glukagonowi, choć jej aktywność jest słabsza i prawdopodobnie nie działa jako pełny agonista receptora glukagonowego. Ponadto donaczyniowe podawanie oksyntomoduliny silnie ogranicza pobieranie pokarmu u szczurów, jednak efekt ten wydaje się być regulowany przez mechanizmy niezależne od receptora GLP-1 (Holst i in., 2013).

GLP-1 wpływa również na regulację przyjmowania pokarmu, a efekt ten jest częściowo zależny od aktywacji receptorów obwodowych. Mechanizm działania receptora GLP-1 (GLP1-R) został stosunkowo dobrze poznany. Receptor ten jest funkcjonalnie sprzężony z cyklazą adenylogową (AC), której aktywacja prowadzi do zwiększenia stężenia cAMP i następnie aktywacji kinazy białkowej A (PKA). Stymulacja receptora przez ligand zwiększa również stężenie Ca^{2+} w cytoplazmie komórki zarówno poprzez nasilony napływ jonów z przestrzeni pozakomórkowej, jak i poprzez uwalnianie ich z magazynów wewnątrzkomórkowych. Wzrost stężenia Ca^{2+} w połączeniu z aktywacją PKA stymuluje translokację oraz egzocytozę ziarnistości wydzielniczych zawierających insulinę (Ahrén, 1998). GLP1-R nie wykazuje

reaktywności krzyżowej z innymi przedstawicielami rodziny peptydów glukagonowych, takimi jak GIP, GLP-2 czy glukagon. Ekspresję mRNA genu GLP1R stwierdzono między innymi w trzustce, ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, przewodzie pokarmowym, układzie sercowo-naczyniowym, nerkach oraz płucach (Park, 2016). Do najlepiej poznanych agonistów GLP1-R należą eksendyna-4 (eksenatyd) oraz liraglutyd. Opisano również szereg innych agonistów tego receptora, takich jak CJC-1131, albiglutyd, ZP10, LY315902, LY2428757, LY2199265 (dulaglutyd), eksendyna (9-39) oraz T-0632 (Q. Chen i in., 2010).

Komórki D (delta), podobnie jak komórki enterochromafinowe, występują w całym przewodzie pokarmowym, jednak ich liczebność jest znacznie mniejsza niż liczebność komórek enterochromafinowych (Sjölund i in., 1983). W błonie śluzowej jelita cienkiego komórki D są zazwyczaj zlokalizowane w dolnej jednej trzeciej krypt jelitowych (Low, 2004). Badania ultrastrukturalne wykazały obecność w tych komórkach pęcherzyków wydzielniczych o średnicy około 200-400 nm (Seretis i in., 2004). Głównym produktem wydzielniczym komórek D jelita cienkiego jest somatostatyna, której obecność stwierdzono również w żołądku, jelicie grubym oraz trzustce (Penman i in., 1983). Hormon ten działa przede wszystkim jako inhibitor wydzielania insuliny, glukagonu oraz soku trzustkowego, a jego działanie hamujące obejmuje także wiele innych komórek wydzielniczych przewodu pokarmowego (Gribble i in., 2018). Somatostatyna ogranicza ponadto wydzielanie śliny i żółci, hamuje motorykę żołądka, zmniejsza przepływ krwi w narządach jamy brzusznej oraz wpływa na procesy wzrostu i regeneracji komórek przewodu pokarmowego (Krejs, 1986). Wykazano również jej działanie immunomodulujące, obejmujące hamowanie proliferacji limfocytów T oraz syntezy immunoglobulin (Stanisz i in., 1986). Somatostatyna jest uznawana za główny hormon hamujący uwalnianie większości hormonów przewodu pokarmowego, w tym również własnego wydzielania, a także funkcje zewnątrzwydzielnicze przewodu pokarmowego i trzustki (Reichlin, 1987). Dotychczas zidentyfikowano sześć podtypów receptorów somatostatyny (SSTR): SSTR1, SSTR2A, SSTR2B, SSTR3, SSTR4 i SSTR5. Receptory te są sprzężone z białkami G i uczestniczą między innymi w hamowaniu aktywności cykazy adenylowej oraz ograniczaniu napływu jonów wapnia do komórek (Theodoropoulou & Stalla, 2013). Podtypy SSTR1 i SSTR2 uczestniczą w podwzgórzowej regulacji wydzielania hormonu wzrostu (Beaudet i in., 1995), natomiast ekspresję mRNA SSTR3 stwierdzono między innymi w neuronach ruchowych rdzenia kręgowego, jądrach ruchowych pnia mózgu oraz neuronach czuciowych zwojów rdzeniowych, co sugeruje udział tego receptora w regulacji funkcji

motorycznych i czuciowych (Señaris i in., 1995). W jelicie cienkim najczęściej występującymi podtypami receptorów są SSTR2A i SSTR5, a następnie SSTR2B i SSTR3 (Gut i in., 2020).

Komórki I odpowiadają za produkcję cholecystokininy (CCK), która stymuluje skurcz pęcherzyka żółciowego i wydzielanie zewnątrzwydzielnicze trzustki, hamuje opróżnianie żołądka i wydzielanie kwasu solnego oraz uczestniczy w regulacji sytości (Geary, 2018).

Neurotensyna produkowana przez komórki N zlokalizowane głównie w jelicie krętym hamuje motorykę przewodu pokarmowego i stymuluje wydzielanie zewnątrzwydzielnicze trzustki. Do jej działań obwodowych zalicza się rozszerzenie naczyń krwionośnych, zwiększenie uwalniania histaminy, stymulację funkcji wewnątrzwydzielniczych i zewnątrzwydzielniczych trzustki, wpływ na aktywność mięśni gładkich przewodu pokarmowego, pobudzanie wydzielania jelitowego oraz ograniczanie przepływu krwi przez tkankę tłuszczową. W ośrodkowym układzie nerwowym neurotensyna wykazuje działanie hipotermiczne i antynocyceptywne oraz uczestniczy w modulacji układu dopaminergicznego i wydzielania prolaktyny. Wydzielanie neurotensyny jest stymulowane przede wszystkim przez posiłki bogate w tłuszcz. Hormon ten nasila działanie sekretyny, CCK i nerwu błędnego na wydzielanie trzustkowe oraz współdziała z innymi enterogastronami, w tym sekretyną, hamując wydzielanie kwasu żołądkowego (Shulkes, 2004).

Komórki K zlokalizowane głównie w błonie śluzowej dwunastnicy i jelita czczego produkują peptyd insulinotropowy zależny od glukozy (GIP, glucose-dependent insulinotropic peptide). Hormon ten hamuje wydzielanie gastryny i kwasu żołądkowego, ogranicza motorykę żołądka, stymuluje wydzielanie insuliny oraz uczestniczy w regulacji metabolizmu tkanki tłuszczowej i kostnej (Gutierrez-Aguilar & Woods, 2011). Wydzielanie GIP jest regulowane przede wszystkim przez składniki odżywcze obecne w świetle jelita, szczególnie tłuszcze. GIP należy do najważniejszych hormonów inkretynowych i wykazuje silne działanie insulinotropowe zarówno u ludzi, jak i u gryzoni. Coraz więcej danych wskazuje również na jego udział w regulacji funkcji adipocytów i metabolizmu energetycznego organizmu (Vella, 2016). Działanie biologiczne GIP jest realizowane za pośrednictwem receptora GIPR, należącego do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G. Ekspresję GIPR stwierdzono między innymi w komórkach A i B trzustki, przewodzie pokarmowym, tkance tłuszczowej, tkance kostnej, przysadce mózgowej oraz mózgu (Verspohl, 2009).

Układ nerwowy jelitowy. Funkcje przewodu pokarmowego, w tym jelita cienkiego, takie jak motoryka, wydzielanie, trawienie i wchłanianie, mogą zachodzić niezależnie, jednak

w warunkach fizjologicznych pozostają ściśle skoordynowane, co umożliwia optymalne wykorzystanie składników odżywczych przez organizm. Procesy te podlegają regulacji jelitowego układu nerwowego (ENS, enteric nervous system). Budowa ENS różni się pomiędzy poszczególnymi odcinkami przewodu pokarmowego (Arciszewski & Szymańczyk, 2021), jednak w obrębie jelita cienkiego układ ten tworzą śródścienne zwoje nerwowe organizujące się w dwa główne sploty: mięśniowy i podśluzówkowy (Furness i in., 2014; Nezami & Srinivasan, 2010). Splot mięśniowy (Auerbacha) zlokalizowany jest pomiędzy warstwą okrężną i podłużną mięśniówki, natomiast splot podśluzówkowy (Meissnera) znajduje się w obrębie błony podśluzowej. Neurony obu splotów tworzą rozbudowaną sieć połączeń zaopatrującą poszczególne warstwy ściany jelita oraz utrzymującą wzajemną komunikację pomiędzy splotami (Furness i in., 2014). Istotne znaczenie mają również połączenia synaptyczne pomiędzy ENS a neuronami autonomicznego układu nerwowego oraz włóknami czuciowymi pochodzenia zewnątrzjelitowego (Timmermans i in., 1992). Za funkcjonalne przedłużenie ENS uznawane są także zwoje śródtrzustkowe, które uczestniczą w regulacji czynności trzustki i przewodu pokarmowego (Li i in., 2019).

Badania wykorzystujące technikę wstecznego znakowania neuronów wykazały, że włókna nerwowe docierające do jelita cienkiego pochodzą ze współczulnych zwojów splotu trzewnego i kręgowego górnego (Kaleczyc i in., 2004), przywspółczulnych jąder nerwu błędnego (Hayakawa i in., 2013) oraz neuronów czuciowych zlokalizowanych w zwojach rdzeniowych odcinka Th8-Th13 rdzenia kręgowego (Pidsudko i in., 2003).

Współczesny stan wiedzy wskazuje, że ENS stanowi układ zdolny do autonomicznej koordynacji wielu funkcji przewodu pokarmowego (Sharkey & Mawe, 2023). Jednocześnie obecność licznych połączeń neuronalnych pomiędzy jelitem a ośrodkowym układem nerwowym świadczy o istnieniu wielopoziomowej regulacji czynności przewodu pokarmowego (Fung & Vanden Berghe, 2020). Wzajemne oddziaływania pomiędzy ENS, autonomicznym układem nerwowym i ośrodkowym układem nerwowym określane są mianem osi mózgowo-jelitowej (Carabotti i in., 2015).

Dotychczasowe badania wykazały obecność w neuronach ENS licznych substancji biologicznie czynnych pełniących funkcje neuroprzekaźników i neuromodulatorów. Analizy morfologiczne i neurochemiczne wskazują, że występowanie niektórych neuroprzekaźników można częściowo powiązać z określonymi populacjami funkcjonalnymi neuronów, takimi jak neurony ruchowe, czuciowe, interneurony czy neurony trzewno-fugalne (Wei i in., 2020).

Oprócz klasycznych neuroprzekaźników, takich jak acetylocholina i noradrenalina, do najważniejszych substancji regulujących czynność przewodu pokarmowego należą naczynioaktywny peptyd jelitowy (VIP), galanina (GAL), tlenek azotu (NO), substancja P (SP) oraz peptyd związany z genem kalcytoniny (CGRP) (McConalogue & Furness, 1994). Współdziałanie neurotransmiterów i neuropeptydów wpływa na motorykę mięśni gładkich, wydzielanie śluzu i enzymów trawiennych, regulację przepływu krwi oraz procesy immunologiczne zachodzące w ścianie przewodu pokarmowego (Vasina i in., 2006).

W obrębie neuronów zaopatrujących przewód pokarmowy zachodzą procesy adaptacyjne umożliwiające dostosowanie komórek nerwowych do zmieniających się warunków środowiska wewnętrznego i zewnętrznego (Lomax i in., 2005). Adaptacja ta może obejmować zmiany morfologiczne, czynnościowe oraz elektrofizjologiczne neuronów (Wood & Kirchgessner, 2004), jednak za najbardziej charakterystyczny przejaw plastyczności ENS uznawane są zmiany neurochemicznego kodowania neuronów (Furness i in., 1995). Wykazano, że procesy te mogą być indukowane przez liczne czynniki fizjologiczne i patologiczne, takie jak wzrost i dojrzewanie organizmu, modyfikacje diety, obecność substancji toksycznych w pokarmie, stany zapalne oraz choroby ogólnoustrojowe i miejscowe przewodu pokarmowego (Sharkey & Kroese, 2001).

2. ŚWINIA JAKO MODEL W BADANIACH LABORATORYJNYCH

Organizmy modelowe to gatunki inne niż człowiek, których wykorzystanie dostarcza licznych korzyści zarówno eksperymentalnych, jak i praktycznych. Zazwyczaj charakteryzują się one łatwością utrzymania w warunkach laboratoryjnych, możliwością prowadzenia badań na większej liczbie osobników oraz wysokim stopniem standaryzacji. Dzięki temu możliwe jest gromadzenie obszernej wiedzy dotyczącej ich biologii, fizjologii i patologii. Badania wykorzystujące organizmy modelowe stanowią podstawę integracji wiedzy pochodzącej z różnych dziedzin nauki oraz umożliwiają prowadzenie analiz porównawczych pomiędzy gatunkami. Ich wykorzystanie opiera się na założeniu, że podstawowe mechanizmy biologiczne są zachowane ewolucyjnie i wykazują znaczne podobieństwo pomiędzy różnymi organizmami. Z tego względu organizmy modelowe są powszechnie wykorzystywane do badania mechanizmów rozwoju chorób oraz poszukiwania nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych (Griffiths i in., 2010).

Głównym celem stosowania modeli zwierzęcych w badaniach przedklinicznych jest poznanie przyczyn, przebiegu oraz możliwości leczenia chorób występujących u człowieka. W zależności od sposobu uzyskania fenotypu chorobowego wyróżnia się modele indukowane, spontaniczne, genetycznie modyfikowane, ujemne oraz sieroce (Mukherjee i in., 2022; Rand, 2008). Każdy z nich znajduje zastosowanie w określonych obszarach badawczych i powinien być dobierany adekwatnie do celu doświadczenia.

Spośród wymienionych typów modeli szczególnie szerokie zastosowanie znajdują modele indukowane. Polegają one na celowym wywołaniu określonego stanu patologicznego w celu uzyskania fenotypu możliwie najlepiej odzwierciedlającego badaną jednostkę chorobową. Kluczowe znaczenie ma w tym przypadku odpowiedni dobór gatunku zwierzęcia, ponieważ stopień podobieństwa pomiędzy modelem a chorobą występującą u człowieka w znacznym stopniu determinuje wartość translacyjną uzyskanych wyników (Mukherjee i in., 2022).

Świnia domowa (*Sus scrofa domestica*) jest obecnie uznawana za jeden z najcenniejszych modeli wykorzystywanych w badaniach biomedycznych i przedklinicznych. Wynika to z licznych podobieństw anatomicznych, fizjologicznych i biochemicznych do organizmu człowieka. Dotyczą one między innymi budowy i funkcjonowania mięśni szkieletowych, uzębienia oraz układów: pokarmowego, sercowo-naczyniowego, oddechowego, moczowego i odpornościowego (Dzięgiel i in., 2018). W wielu aspektach świnia wykazuje większe podobieństwo do człowieka niż tradycyjnie wykorzystywane modele gryzoniowe, co zwiększa przydatność tego gatunku w badaniach translacyjnych. Szczególne znaczenie ma to w przypadku chorób przewodu pokarmowego i trzustki, gdzie podobieństwa anatomiczne i czynnościowe umożliwiają stosunkowo wierne odtworzenie procesów patofizjologicznych obserwowanych u ludzi.

3. ZAPALENIE TRZUSTKI INDUKOWANE CERULEINĄ W BADANIACH MODELOWYCH

Jednym z najczęściej wykorzystywanych modeli doświadczalnych zapalenia trzustki jest indukcja stanu zapalnego poprzez nadmierną stymulację części zewnątrzwydzielniczej tego narządu. Szczególnie szerokie zastosowanie znalazł model ceruleinowy, który pod względem zmian histopatologicznych wykazuje podobieństwo do wczesnych faz ostrego zapalenia trzustki obserwowanego u ludzi (Dąbrowski i in., 1999). W modelu tym ceruleina podawana

jest najczęściej dootrzewnowo lub dożylnie, natomiast nasilenie wywołanych zmian zależy od zastosowanej dawki oraz liczby podań (Chan & Leung, 2007).

Ceruleina jest decapeptydem wyizolowanym pierwotnie ze skóry rzekotki szmaragdowej (*Litoria caerulea*) i wykazuje silne podobieństwo strukturalne oraz funkcjonalne do cholecystokininy (CCK). Działając poprzez receptory CCK obecne na komórkach pęcherzykowych trzustki, powoduje nadmierną stymulację części zewnątrzwydzielniczej narządu. Następstwem tego procesu jest zaburzenie wewnątrzkomórkowego transportu enzymów trawiennych, ich gromadzenie w komórkach pęcherzykowych oraz przedwczesna aktywacja proenzymów trzustkowych, w tym trypsynogenu, prowadząca do uszkodzenia trzustki i rozwoju reakcji zapalnej (Kim, 2008). Ceruleina jest również silnym stymulatorem skurczów pęcherzyka żółciowego i mięśniówki jelit oraz umiarkowanym stymulatorem wydzielania żołądkowego (Yang i in., 2020).

Liczne badania potwierdziły przydatność modelu ceruleinowego do indukowania zapalenia trzustki u różnych gatunków zwierząt (Aghdassi i in., 2011; Saluja & Dudeja, 2013), w tym również u świni i świni miniaturowej (Kahle i in., 1991; Tomaszewska i in., 2023). Oprócz modelu ceruleinowego stosowane są również inne metody indukcji zapalenia trzustki u świń, obejmujące procedury powszechnie wykorzystywane w innych modelach zwierzęcych, takie jak podwiązanie przewodu trzustkowego (Boerma i in., 2003), podanie kwasu olejowego do tętnicy trzustkowej (Vollmar i in., 1991) oraz wsteczną perfuzję przewodu trzustkowego z wykorzystaniem substancji stymulujących część zewnątrzwydzielniczą trzustki, takich jak taurocholan sodu (Ke i in., 2012; Kinnala i in., 1999) lub taurocholan sodu w połączeniu z trypsyną (model trypsynowo-taurocholanowy) (Meriläinen i in., 2008; H. Wang, 2005).

Jednak klasyczny model oparty na indukcji ceruleiną, opracowany w 1977 roku przez Lampela i Kerna (Lampel & Kern, 1977), pozostaje najlepiej scharakteryzowanym i najbardziej rozpowszechnionym modelem stosowanym w badaniach przedklinicznych. Pozwala on uzyskać obraz zapalenia trzustki wykazujący liczne podobieństwa biochemiczne, patofizjologiczne i strukturalne do choroby występującej u ludzi (Adler i in., 1990; Ribet i in., 1976). Model ten znajduje zastosowanie zarówno w badaniach ostrego, jak i przewlekłego zapalenia trzustki (PZT), ponieważ stopień nasilenia zmian można kontrolować poprzez odpowiedni dobór dawki oraz częstotliwości podawania ceruleiny (Konturek i in., 1993).

W modelu ceruleinowym obserwuje się wyraźną zależność typu dawka-odpowiedź, przejawiającą się stopniowym nasilaniem zmian strukturalnych i biochemicznych w trzustce

wraz ze wzrostem dawki substancji. Zakres tych zmian zależy również od drogi podania ceruleiny (Beglinger i in., 2009; Vaquero i in., 1998). U ludzi działanie wydzielnicze ceruleiny uzyskiwano po szybkim pojedynczym podaniu dożylnym w dawce 20 ng/kg m.c. (Wu i in., 2021). Opisano również badania z udziałem pacjentów, którym ceruleinę podawano domięśniowo w dawkach 0,25-1 µg/kg m.c. (Willemer i in., 2008).

U szczurów stosowano zarówno pojedyncze dożylne bolusy ceruleiny w dawkach 0,1; 0,25; 1; 10 lub 50 µg/kg m.c., jak i wielokrotne podania w dawce 20 µg/kg m.c./godz. wykonywane czterokrotnie w odstępach jednogodzinnych w celu badania wydzielania trzustkowego (Williams i in., 2014). W części doświadczeń wykorzystywano również ciągły dożylny lub dootrzewnowy wlew ceruleiny w dawce stymulującej 2,5 µg/kg m.c./godz., dawce supramaksymalnej 5 µg/kg m.c./godz. (Bansod i in., 2020; Robberecht i in., 1975), a także w dawkach 7,5 µg/kg m.c./godz. lub 15 µg/kg m.c. podawanych czterokrotnie w odstępach jednogodzinnych (Freitag i in., 2006; Schrauwen & Houvenaghel, 1979). U myszy ceruleinę podawano dootrzewnowo w dawce 50 µg/kg m.c. raz na godzinę, łącznie sześciokrotnie (Demir i in., 2015).

Stosowane dawki ceruleiny różnią się istotnie pomiędzy gatunkami oraz zależą od drogi podania i celu doświadczenia. U psów dawki ceruleiny podawanej różnymi drogami wynosiły od 1-5 oraz 50-100 ng/kg m.c., poprzez 1 oraz 3-4 µg/kg m.c. w podaniu jednorazowym, aż do 0,3-0,6, 1-5 ng/kg m.c./min. podczas ciągłej infuzji dożylnej (Schneider & Whitcomb, 2002) oraz 1,2 µg/kg m.c./godz. (Foitzik i in., 2000). Jak wspomniano wcześniej, ceruleina jest analogiem CCK, a u świń wykazuje *in vivo* siłę działania zbliżoną do świńskiej CCK-33 (Völzke i in., 2005). Dawki stosowane w badaniach na świniami obejmowały między innymi 0,25; 0,5; 1 oraz 2 µg/kg m.c. podawane w pojedynczym szybkim wstrzyknięciu dootrzewnowym (Shimizu, 2008), 0,1; 0,3 i 3 µg/kg m.c./min. (Martínez-Noguera & D'Onofrio, 2007) oraz 5 µg/kg m.c./godz. podawane w ciągłym wlewie dożylnym (Grupp i in., 2019; Kuan i in., 2021).

W wielu zwierzęcych modelach PZT indukowanych ceruleiną obserwuje się wyraźne objawy bólowe, które korelują ze stopniem zmian patomorfologicznych oraz wzrostem aktywności neuronów czuciowych. Objawy te są porównywalne do bólu występującego u ludzi z zapaleniem trzustki (Klauss i in., 2018; Newcom i in., 2002). Pomimo że u świń rozwija się obraz histopatologiczny zbliżony do obserwowanego u ludzi z PZT, przebieg choroby nie jest zwykle związany z występowaniem wyraźnych objawów bólowych (Klauss i in., 2018). W

większości opisanych modeli nie obserwowano również istotnych zmian behawioralnych, takich jak ograniczenie aktywności, wygięcie grzbietu czy anoreksja (Ayuso i in., 2013; Bieger i in., 1977), ani jawnych objawów niewydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki, takich jak stolce tłuszczowe (Sarner & Cotton, 1984).

Patogeneza zapalenia trzustki jest stosunkowo dobrze poznana. Jest to proces zapalny inicjowany i/lub podtrzymywany przez zaburzenia mechanizmów regulujących syntezę, transport, magazynowanie oraz wydzielanie enzymów trawiennych przez komórki pęcherzykowe trzustki (Castellheim i in., 2009; Hoque i in., 2012). W przypadku przewlekłego zapalenia trzustki indukowanego ceruleiną istotną rolę odgrywa odpowiedź zapalna rozwijająca się niezależnie od aktywacji trypsynogenu. Ceruleina stymuluje komórki pęcherzykowe za pośrednictwem receptora cholecystokininowego (CCK) sprzężonego z białkiem G. W proces ten zaangażowane są między innymi szlak kinazy białkowej C (PKC) oraz szlak kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K), których aktywacja prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia i uruchomienia licznych szlaków sygnałowych, w tym aktywacji czynnika jądrowego kappa B (NF- κ B) (Pezzilli i in., 2000).

Aktywacja NF- κ B prowadzi do zwiększonej ekspresji licznych genów prozapalnych, w tym czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α) oraz białka chemotaktycznego monocyto-1 (MCP-1), odgrywającego kluczową rolę w rekrutacji makrofagów do ogniska zapalnego. Wskazuje to, że aktywacja NF- κ B stanowi jeden z centralnych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój i podtrzymywanie reakcji zapalnej w trzustce oraz wpływa na procesy apoptozy, proliferacji i różnicowania komórek (Pezzilli i in., 2000; Yin i in., 2020). TNF- α , wydzielany głównie przez aktywowane makrofagi, indukuje apoptotyczne i nekrotyczne uszkodzenie komórek pęcherzykowych oraz odgrywa istotną rolę w rozwoju doświadczalnego zapalenia trzustki (Cui i in., 2017; Pezzilli i in., 2000).

Oprócz TNF- α w patogenezie zapalenia trzustki uczestniczą również inne cytokiny prozapalne. Interleukina 6 (IL-6), wykazująca zarówno właściwości prozapalne, jak i przeciwzapalne, może nasilać odpowiedź zapalną między innymi poprzez wpływ na aktywność limfocytów T pomocniczych typu 17 (Th17) oraz stymulację syntezy białek ostrej fazy w wątrobie (Kiriyaama i in., 2010; Tiribelli & Ostrow, 1996). Z kolei interleukina 1 β (IL-1 β) sprzyja napływowi neutrofili do miejsca zapalenia oraz indukuje produkcję innych cytokin i chemokin prozapalnych (Witt i in., 2007). Najważniejszą cytokiną przeciwzapalną jest natomiast interleukina 10 (IL-10), która hamuje odpowiedź typu Th1, ogranicza uwalnianie

cytokin prozapalnych oraz zmniejsza aktywność makrofagów i monocytów. Wykazano również, że stężenia IL-1 β , IL-6 i IL-10 w surowicy wzrastają po 6-12 godzinach od indukcji ciężkiego ostrego zapalenia trzustki u świń (Su i in., 2002).

3. PROBLEM BADAWCZY

Pomimo że przewlekłe zapalenie trzustki jest jednostką chorobową pierwotnie dotyczącą trzustki, coraz więcej danych wskazuje, że jego następstwa mogą obejmować również jelito cienkie. Dotyczy to zarówno zmian strukturalnych ściany jelita, jak i zaburzeń funkcjonowania układu enteroendokrynnego, bariery jelitowej oraz jelitowego układu nerwowego. Mechanizmy leżące u podłoża tych zmian pozostają jednak słabo poznane, szczególnie w modelach dużych zwierząt.

Niniejsza praca ma na celu określenie, czy oraz w jakim zakresie przewlekłe zapalenie trzustki indukowane ceruleiną prowadzi do zmian morfologicznych, histomorfometrycznych i molekularnych w jelicie czczym świni, ze szczególnym uwzględnieniem populacji komórek enteroendokrynnych oraz struktur jelitowego układu nerwowego.

Ustalenie charakteru obserwowanych zmian pozwoli ocenić, czy dominują wśród nich procesy adaptacyjne, degeneracyjne czy też współwystępowanie obu tych komponentów. Uzyskane wyniki mogą również przyczynić się do lepszego poznania zależności funkcjonalnych w obrębie osi trzustka-jelito w przebiegu przewlekłego zapalenia trzustki.

4. HIPOTEZA PRACY

Postawiono hipotezę, że przewlekłe zapalenie trzustki indukowane ceruleiną prowadzi do istotnej przebudowy morfologicznej i molekularnej jelita czczego świni, obejmującej zmiany w grubości poszczególnych warstw ściany jelita, populacjach komórek enteroendokrynnych oraz organizacji jelitowego układu nerwowego.

Założono, że zmiany te stanowią element złożonej odpowiedzi jelita na przewlekły proces chorobowy toczący się w trzustce i obejmują zarówno mechanizmy adaptacyjne, jak i degeneracyjne związane z zaburzeniem osi czynnościowej trzustka-jelito.

5. CEL PRACY

Celem pracy było wykazanie, czy przewlekłe zapalenie trzustki indukowane ceruleiną prowadzi do przebudowy strukturalnej i molekularnej jelita czczego świni, obejmującej zmiany w morfometrii ściany jelita, ekspresji genów hormonów enteroendokrynnych oraz organizacji struktur neurojelitowych.

Do weryfikacji przedstawionej hipotezy posłużyły następujące szczegółowe cele pracy:

1. Określenie zmian histologicznych i histomorfometrycznych w ścianie jelita czczego świni w modelu ceruleinowym przewlekłego zapalenia trzustki.
2. Analiza zmian strukturalnych w obrębie jelitowego układu nerwowego jelita czczego w warunkach PZT.
3. Określenie zmian w ekspresji mRNA genów związanych z funkcją komórek enteroendokrynnych oraz regulacją bariery jelitowej w jelicie czczym świni w modelu PZT.
4. Określenie zmian w liczbie i rozmieszczeniu wybranych populacji komórek enteroendokrynnych (GIP-immunoreaktywnych i GLP-1-immunoreaktywnych) w jelicie czczym w warunkach PZT.

Realizacja powyższych celów pozwoli na pogłębienie wiedzy dotyczącej zmian jelitowych towarzyszących PZT oraz mechanizmów regulacyjnych osi trzustka–jelito.

6. MATERIAŁ I METODY

1. SCHEMAT DOŚWIADCZENIA

Doświadczenie przeprowadzono z wykorzystaniem 10 zdrowych, pozbawionych wad wrodzonych niekastrowanych samców prosiąt świni domowej rasy polska biała zwisłoucha (pzb). Pozyskane prosięta w chwili przybycia mające ok. 10 tygodni, pochodziły z naturalnych porodów macior wieloródek. Eksperyment wykonano w Instytucie Zootechniki Państwowym Instytucie Badawczym w Balicach, po uzyskaniu zgody II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (numer zgody 377/2020).

Po przybyciu zwierzęta zakwaterowano w indywidualnych doświadczalnych kojcach i poddano 7-dniowej adaptacji do nowego otoczenia, diety oraz opiekunów. Miały one swobodny dostęp do standardowej mieszanki pokarmowej dostosowanej dla świń w tym wieku i pokrywającej ich zapotrzebowanie na składniki pokarmowe. Świnie miały również stały dostęp do wody oraz zabawek, które miały na celu urozmaicenie ich środowiska. Przed przystąpieniem do głównej części doświadczenia, zwierzęta zostały zważone i podzielone na dwie grupy eksperymentalne (po $n = 5$ osobników w każdej) w sposób zapewniający równomierny podział masy ciała w obu grupach. Pierwsza grupa składała się z zdrowych osobników i pełniła funkcję grupy kontrolnej, natomiast drugą grupę stanowiły świny z modelem PZT.

Świnie z grupy PZT były poddawane iniekcjom domięśniowym ceruleiny (C9026, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) w dawkach $1\mu\text{g/kg}$ m.c. dziennie przez sześć dni w celu indukcji przewlekłego zapalenia trzustki (Celiński i in., 2011). Świnie z grupy kontrolnej otrzymywały iniekcje z soli fizjologicznej. Stan zdrowia wszystkich zwierząt był regularnie kontrolowany przez doświadczonego lekarza weterynarii. Masa ciała każdej ze świń była określana raz w tygodniu na podstawie pomiarów na wadze platformowej. Eksperyment był kontynuowany do momentu, gdy w grupie PZT zaobserwowano statystycznie istotny spadek masy ciała w porównaniu do grupy kontrolnej. Doświadczenie zakończono po siódmym tygodniu, tj. w kolejnym tygodniu, w którym zaobserwowano wspomnianą różnicę w masie ciała zwierząt. Na koniec eksperymentu wszystkie świny poddano eutanazji farmakologicznej przez lekarza weterynarii przy użyciu Morbitalu ($133,3\text{ mg/mL}$ *Sodium pentobarbitone* + $26,7\text{ mg/mL}$ *Pentobarbitone*, Biowet, Puławy).

2. PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADAŃ

Materiał badawczy do analiz qPCR został uzyskany od zwierząt natychmiast po ich uboju, w ciągu 15 minut od śmierci zwierzęcia. Odcinki jelita czczego zostały otwarte przy krezce, przepłukane roztworem soli fizjologicznej i natychmiast zamrożone w ciekłym azocie. Następnie, do czasu przeprowadzenia analiz, pobrane próbki były przechowywane w temperaturze -86°C w zamrażarce niskotemperaturowej.

Inne wycinki również pobrano z jelita czczego (50% długości), a następnie przepłukano w schłodzonym roztworze soli fizjologicznej. Po przepłukaniu, pobrane fragmenty umieszczono w kasetkach histologicznych, a następnie utrwalono je przez 24 godziny w zbuforowanym 4% roztworze formaliny (pH 7,0). Następnym etapem było płukanie w bieżącej wodzie przez 4 godziny, odwodnienie w serii roztworów alkoholu etylowego (EtOH) o wzrastającym gradiencie stężeń (30%, 50%, 70%, 96%) z zatrzymaniem na każdym etapie na 3 godziny. Po odwodnieniu, wycinki zostały poddane końcowemu prześwietleniu i odwodnieniu przy użyciu odczynników bezksylenowych Ottix Shaper i Ottix Plus (DiaPath, Włochy), a następnie przepojone parafiną za pomocą procesora tkankowego STP 120 (Thermo Scientific, USA).

Bloczki parafinowe sformowano wykorzystując zatapiarkę modułową EC 350 (Especialidades Medicas, Hiszpania). Do cięcia skrawków użyto manualny mikrotom rotacyjny HM 360 (Thermo Scientific, USA). Gotowe skrawki naniesiono na szkiełka podstawowe Polysine Menzel (ThermoFisher, USA) i wysuszono wstępnie przez 20 minut na płycie grzewczej PC 800 (Bio-Optica, Włochy) o temperaturze 48°C . Końcowe suszenie szkiełek odbyło się w temperaturze 37°C , w cieplarni CG (Wamed, Polska) przez okres co najmniej 48 godzin.

3. ANALIZA QPCR

Całkowity RNA został wyizolowany z pobranych próbek jelita przy użyciu zestawu PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, USA), postępując zgodnie z instrukcjami producenta. Aby usunąć genomowe DNA, wyizolowany RNA poddano obróbce za pomocą DNase I (PureLink DNase Set; Invitrogen, USA). Stężenie RNA i ewentualne zanieczyszczenia białkowe i chemiczne zmierzono za pomocą spektrofotometru Epoch 2000 (Agilent Technologies, USA) wyposażonego w płytkę Take3, umożliwiającą pomiary w mikroobjętościach. Integralność całkowitego RNA oceniono przeprowadzając elektroforezę w 2% żelu agarozowym. Do

przeprowadzenia transkrypcji na cDNA wykorzystano 250 ng całkowitego RNA oraz zestaw TranScriba noGenome Kit (A&A Biotechnology, Polska). Następnie otrzymany cDNA został poddany analizie RT-qPCR, by zbadać ekspresję genów *GIP*, *GIPR*, *GCG* i *GLP1R*, *NPY*, *IL10*, *FABP2* kodujących odpowiednio GIP, receptor GIP, proglukagon, receptor GLP1, neuropetyd Y, interleukinę IL-10, oraz jelitowe białko wiążące kwasy tłuszczowe-2. Analizę RT-qPCR przeprowadzono z użyciem zestawu RT PCR Mix SYBR Green (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) na aparacie ABI 7500 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Parametry reakcji PCR były następujące: denaturacja wstępna w temperaturze 95 °C (3 min) w celu aktywacji polimerazy Taq, 45 cykli obejmujących etap denaturacji DNA w temperaturze 95 °C (15 sek.), przyłączanie pary starterów w temperaturze 57 °C (30 sek.), etap wydłużania łańcucha DNA w temperaturze 72 °C (30 sek.). Wydajność reakcji oraz specyficzność produktów PCR weryfikowano analizując krzywe topnienia oraz przeprowadzając elektroforezę produktów w żelu agarozowym. Jako kontrolę endogenną wybrano dwa geny, *RPS29* i *ACTB*, które wykazały stabilny poziom ekspresji we wszystkich analizowanych typach tkanek oraz warunkach eksperymentalnych. Każdą próbkę poddano analizie w trzech powtórzeniach technicznych. Względną ekspresję genów *GIP*, *GIPR*, *GCG* i *GLP1R*, obliczono stosując metodę $-\Delta\Delta CT$ i normalizując do średniej geometrycznej poziomu ekspresji genów referencyjnych *RPS9* i *ACTB*. Sondy (startery, Tabela 1) wykorzystane w badaniach zostały zaprojektowane z użyciem oprogramowania Primer3web (<https://primer3.ut.ee>) i syntetyzowane przez firmę Genomed (Warszawa, Polska).

Tabela 1. Charakterystyka starterów użytych w reakcji qPCR

Gen	Startery	Amplikon, bp	Ekson	Numer dostępu GenBank
<i>GCG</i>	F: GATAATCTTGCCACCCGAGA R: TTGGCATGCAAAGCAATATG	179	5-6	XM_005671882.3
<i>GLPIR</i>	F: AACCGGACCTTTGACGACTA R: ATTCCTCACACTCGGACAGG	198	3-5	NM_001256594.1
<i>GIP</i>	F: TACGCCGAGGGGACTTTTAT R: AGACTGATGGGCCAGCTCTA	162	3-4	XM_013980014.2
<i>GIPR</i>	F: CTCATCTTCATCCGCATCCT R: TCCTCAGTCACAGGAGCAAA	155	11-12	XM_021094579.1
<i>NPY</i>	F: CGGAGGACTTGGCCAGATAC R: CCCATCACCACACAGAAGGG	174	1-3	NM_001256367.1
<i>IL10</i>	F: GAAGCTGAAGACCCTCAGGC R: TGTCAAACCTACCCATGGCT	146	3-5	NM_214041.1
<i>FABP2</i>	F: CGAGAAATTATCGGGGATGA R: TGCTTGATGAGGAGAGGAAAA	168	3-4	NM_001031780.1
<i>RPS9</i>	F: CCTCGACCAAGAGCTGAAG R: CCTCCAGACCTCACGTTTGTTT	64	2-3	NM_001444744
<i>ACTB</i>	F: TCCCTGGAGAAGAGCTACGA R: AGGTAGTTTCGTGGATGCCG	133	4-5	NM_001444420.1

Geny kodujące: GIP (*GIP*), receptor GIP (*GIPR*), proglukagon (*GCG*), receptor 1 glukagonu (*GLPIR*), neuropeptyd Y (*NPY*), interleukinę IL-10 (*IL10*), jelitowe białko wiążące kwasy tłuszczowe-2 (*FABP2*) oraz geny referencyjne *RPS9* i *ACTB*.

4. BARWIENIA PREPARATÓW I REAKCJA IMMUNOHISTOCHEMICZNA

Preparaty poddano barwieniu trójskrawkowym Massona, zgodnie z protokołem podanym w Tabeli 2 (Suvarna i in., 2019).

Tabela 2. Protokół barwienia Massona

Nazwa etapu		Czas
1.	Odparafinowanie i nawodnienie skrawków:	
	• ksylen I	3 min.
	• ksylen II	5 min.
	• alkohol 100% I	5 min.
	• alkohol 100% II	3 min.
	• alkohol 96% I	3 min.
	• alkohol 70%	3 min.
2.	Płukanie w wodzie destylowanej	5 min.
3.	Inkubacja w roztworze Bouina	15 min.
4.	Płukanie w wodzie destylowanej	
5.	Barwienie hematoksyliną Weigerta	5 min.
6.	Kilkukrotne płukanie w wodzie destylowanej	
7.	Różnicowanie w kwaśnym alkoholu	5 s.
8.	Kilkukrotne płukanie w wodzie destylowanej	
9.	Barwienie w roztworze czerwieni Biebrich-kwaśna fuksyna	5 min.
10.	Kilkukrotne płukanie w wodzie destylowanej	
11.	Barwienie w 1% roztworze kwasu fosfomolibdenowego	2 min.
12.	Barwienie w roztworze błękitu anilinowego	5 min.
13.	Płukanie w wodzie destylowanej	
14.	Płukanie w roztworze kwasu octowego lodowego	
15.	Płukanie w wodzie destylowanej	
16.	Odwodnienie preparatów:	
	• alkohol 96% II	kilka sek.
	• alkohol 100% III	3 min.
	• alkohol 100% IV	3 min.
	• ksylen III	2 min.
	• ksylen IV	2 min.
17.	Zamknięcie przy użyciu medium	

Odczynniki chemiczne użyte do przeprowadzenia poszczególnych etapów lub wykonania odpowiednich reagentów: alkohol etylowy 96%, 100% (Poch, Gliwice), ksylen (Poch, Gliwice), kwas octowy lodowaty (Poch, Gliwice), Hematoksylina (75290, Sigma-Aldrich, USA), chlorek żelaza III (15510, Sigma-Aldrich, USA), kwas solny 35-38% (Poch, Gliwice), czerwień Biebrich (260905, Sigma-Aldrich, USA), kwaśna fuksyna (42685, Sigma-Aldrich, USA), kwas fosfomolibdenowy (Sigma-Aldrich, USA), błękit anilinowy (43755, Sigma-Aldrich, USA), Shandon Consul-Mount (Thermo Scientific, USA), woda destylowana.

Reakcje immunohistochemiczne (IHC) przeprowadzano zgodnie z protokołem przedstawionym w Tabeli 3 z wykorzystaniem następujących przeciwciał:

- Monoklonalne mysie przeciwciało IgG przeciwko HuC/D (A-21271, Invitrogen, ThermoFisher, USA);
- Poliklonalne królicze przeciwciało IgG przeciwko GIP (18034-1-AP, Proteintech, USA);
- Poliklonalne królicze przeciwciało IgG przeciwko GLP (15954-1-AP, Proteintech, USA).

Tabela 3. Protokół przeprowadzenia reakcji immunohistochemicznej IHC

	Nazwa etapu	Czas
1.	Odparafinowanie i nawodnienie skrawków:	
	• ksylen I	3 min.
	• ksylen II	5 min.
	• alkohol 100% I	5 min.
	• alkohol 100% II	3 min.
	• alkohol 96% I	3 min.
	• alkohol 70% I	3 min.
2.	Płukanie w wodzie dejonizowanej	5 min.
3.	Odzyskiwanie antygenowości przez podgrzewanie w 10 mM roztworze buforu cytrynianowego z dodatkiem 0.05% Tween 20 (pH 6,0) w temperaturze 80°C multicookerze ciśnieniowym (RMC-PM381-E Redmond, Chiny)	8 min.
4.	Studzenie w temperaturze pokojowej	20 min.
5.	Trzykrotne płukanie w 0,1 M PBS (pH 7,3)	
6.	Blokowanie aktywność endogennej peroksydazy w 3% nadtlenu wodoru (H ₂ O ₂).	5 min.
7.	Płukanie w PBS	
8.	Minimalizowanie niespecyficznego barwienia poprzez inkubowanie w buforze blokującym (5% surowicy bydlęcej BSA)	5 min.
9.	Trzykrotne płukanie w PBS	
10.	Inkubacja z przeciwciałem pierwszorzędowym (1:100 w buforze do rozcieńczeń) w temperaturze 4°C w komorze wilgotnej. Kontrola specyficzności: pominięcie przeciwciała pierwszorzędowego w jednej z prób, zastępując je roztworem PBS.	12 godz.
11.	Trzykrotne przemycie w PBS	
12.	Inkubacja z polimerem znakowanym peroksydazą chrzanową (HRP) sprzężonym z przeciwciałem drugorzędowym (anty-Rb IgG) w temperaturze pokojowej w komorze wilgotnej.	30 min.
13.	Wizualizacja odczynu IHC w DAB	Do zajścia reakcji
14.	Płukanie w wodzie destylowanej	

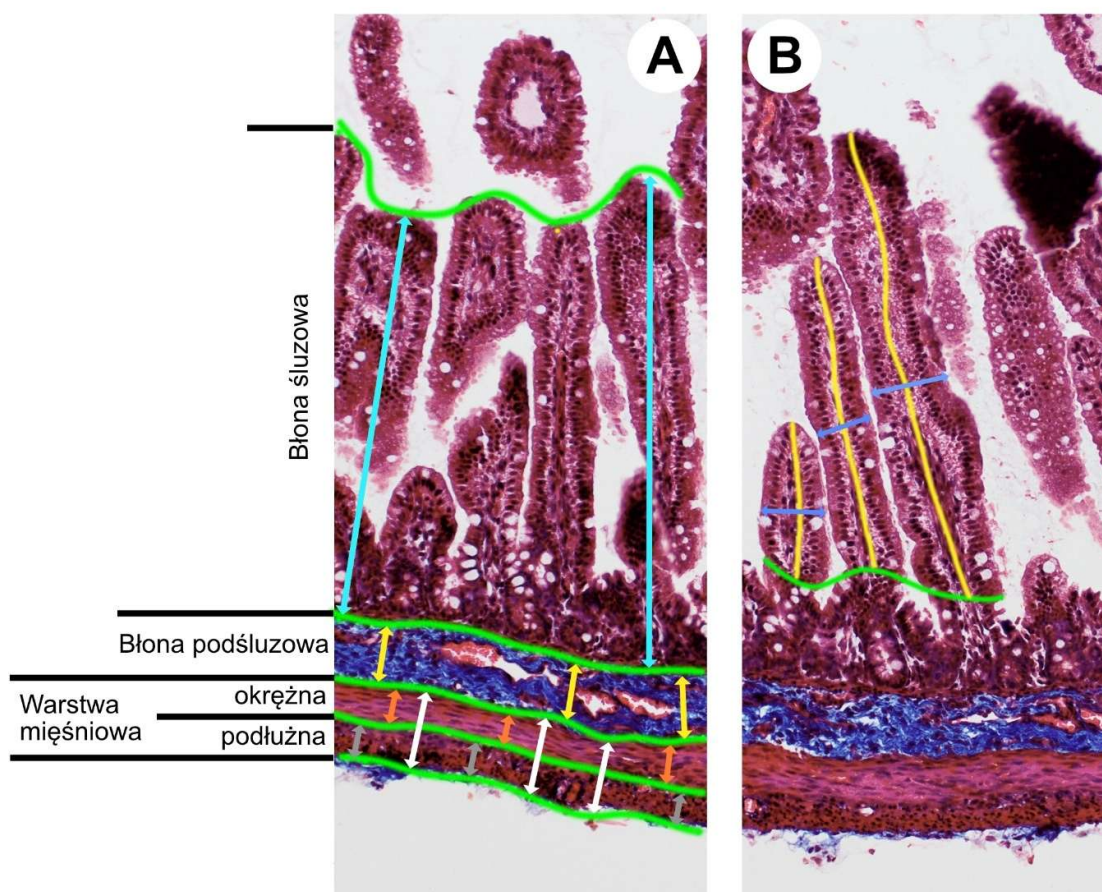
- | | | |
|-----|--|---------|
| 15. | Barwienie kontrastujące w hetmatoksylinie Mayera | |
| 16. | Zobojętnienie w wodzie amoniakalnej (0,037 mM) | 3 sek. |
| 17. | Płukanie w wodzie bieżącej | 10 min. |
| 18. | Płukanie w wodzie destylowanej | |
| 19. | Odwodnienie preparatów: | |
| | ● alkohol 70% II | 3 min. |
| | ● alkohol 96% II | 3 min. |
| | ● alkohol 100% III | 3 min. |
| | ● alkohol 100% IV | 2 min. |
| | ● ksylen III | 2 min. |
| | ● ksylen IV | 3 min. |
| 20. | Zamknięcie przy użyciu medium | |

Odczynniki chemiczne użyte do przeprowadzenia poszczególnych etapów lub wykonania odpowiednich reagentów: alkohol etylowy 96%, 100% (Poch, Gliwice), ksylen (Poch, Gliwice), Hematoksylina (Mar-four, Konstantynów Łódzki), cytrynian sodu dwuwodny (S4641, Sigma-Aldrich, USA), Tween 20 (P1379, Sigma-Aldrich, USA), PBS (P4417, Sigma-Aldrich, USA), nadtlenek wodoru (18304, Sigma-Aldrich, USA), Emerald Anitobody Diluent (Cell Marque Corp., USA), UltraVision Protein Block (Thermo Scientific, USA), BrightVision poli-HRP-anty Ms/Rb IgG detection system (ImmunoLogic WellMed B.V., Holandia), woda amoniakalna 25% (Sigma-Aldrich, USA), tetrachlorek 3,3'-diaminobenzydyny – DAB (#D5905, Sigma-Aldrich, USA), Shandon Consul-Mount (Thermo Scientific, USA), woda dejonizowana.

5. ANALIZA HISTOMORFOMETRYCZNA

Przeprowadzona analiza histomorfometryczna obejmowała:

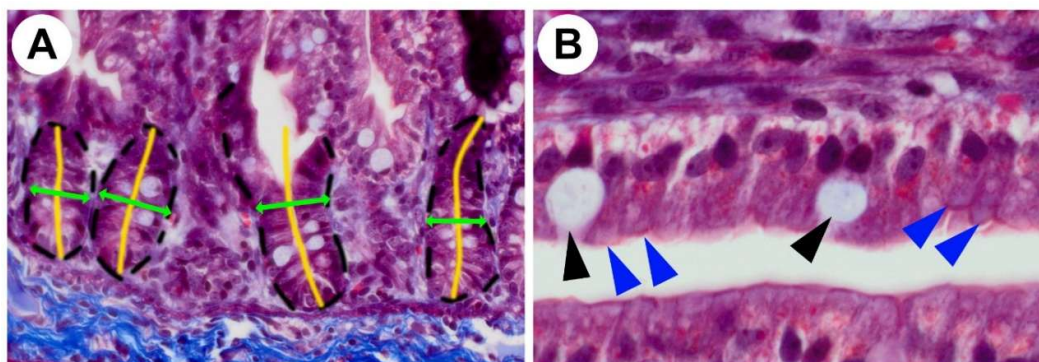
- **Pomiar grubości błony śluzowej, podśluzowej i mięśniowej:** Pomiarów dokonano na nieuszkodzonych fragmentach preparatów, bez widocznych nieciągłości tkanki. Zmierzono grubości błony śluzowej, błony podśluzowej, tkanki łącznej, mięśniówki okrężnej oraz mięśniówki podłużnej. Na podstawie tych pomiarów wyznaczono stosunek grubości błony mięśniowej do śluzowej oraz stosunek grubości błony podśluzowej do śluzowej (Rycina 1A).
- **Określenie długości i szerokości kosmków jelitowych:** Pomiarom poddano jedynie nienaruszone kosmki, które miały wyraźnie zarysowane kontury i były widoczne na przekroju przez całą swoją długości, łącznie z przestrzenią mleczną oraz nabłonkiem. Długość kosmka mierzono w jego środkowej części, od podstawy - zdefiniowanej jako linia łącząca ujścia krypt po obu stronach kosmka - do jego szczytu. Szerokość kosmka mierzono na połowie jego wysokości (Rycina 1B).



Rycina 1. Schemat wykonywania pomiarów histomorfometrycznych (A) grubości błony śluzowej, podśluzowej i mięśniowej oraz (B) długości i szerokości kosmków jelitowych.

- **Określanie głębokości i szerokości i liczby krypt jelitowych:** Pomiaru ograniczono do krypt otwartych, z widoczną jamą i nabłonkiem. Głębokość krypt mierzono w ich środkowej części, od dna do podstawy kosmków. Szerokość krypt mierzono na połowie ich głębokości (Rys. 2A).
- **Wyznaczenie stosunku długości kosmka do głębokości krypty oraz liczby kosmków i krypt:** Stosunek długości kosmka do głębokości krypty (VH/CD) obliczono dla dobrze zdefiniowanych, bezpośrednio przylegających do siebie par kosmek-krypta. Aby określić liczbę kosmków i krypt, zaznaczono odcinek przekroju jelita i zmierzono odpowiadającą mu długość jego błony surowiczej, a następnie dokonano zliczenia wszystkich kosmków oraz krypt (aktywnych, nieaktywnych oraz podzielonych) znajdujących się w tym odcinku. Wyniki zaprezentowano jako liczbę kosmków i krypt na 1 mm długości błony surowiczej.

- **Określanie liczby enterocytów i komórek kubkowych oraz wyznaczenie stosunku liczby enterocytów do komórek kubkowych:** Zliczenia dokonano, analizując środkową część kosmków na wyznaczonym odcinku o znanej długości. W pomiarach uwzględniono tylko kompletne enterocyty, z wyraźnie widocznym jądrem komórkowym i rąbkiem szczoteczkowym. Wyniki przedstawiono jako liczbę enterocytów i komórek kubkowych na 100 μm długości kosmka oraz ich stosunek liczebności (Rycina 2B).

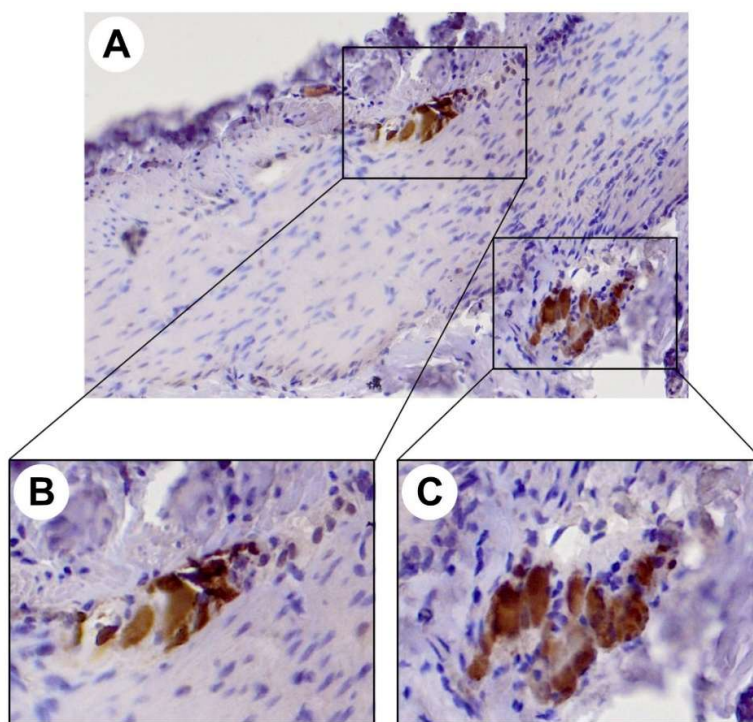


Rycina 2. Schemat wykonywania pomiarów histomorfometrycznych (A) głębokości i szerokości i liczby krypt jelitowych oraz (B) liczby enterocytów (niebieskie groty) i komórek kubkowych (czarne groty).

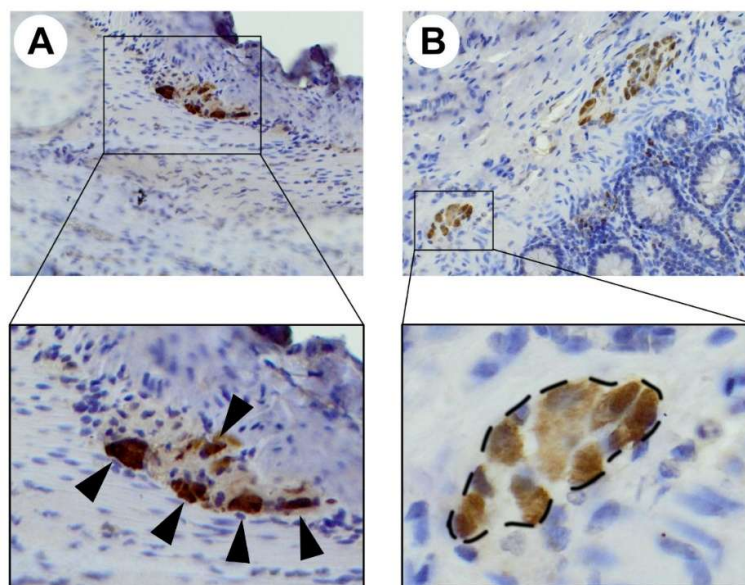
Dokumentację fotograficzną wysokiej rozdzielczości (2070x1548 pikseli) barwionych preparatów wykonano przy użyciu mikroskopu optycznego Olympus CX43 (Olympus, Japonia), wyposażonego w kamerę UC50 (Olympus, Japonia) oraz oprogramowanie do akwizycji obrazów Cellsens (Olympus, Tokio, Japonia). Rejestracja zdjęć odbyła się w trybie jasnego pola. Do przeprowadzenia analizy histomorfometrycznej wykonanych zdjęć mikroskopowych posłużono się programem ImageJ (National Institute of Health, USA) w wersji 1.54f. Przy realizacji pomiarów histomorfometrycznych wykorzystano także tablet graficzny CTE 430 (Wacom, Japonia).

Przeprowadzona analiza reakcji IHC obejmowała:

- **Ocena mięśniowych i podśluzówkowych zwojów nerwowych:** W tym celu preparaty poddano reakcji immunohistochemicznej (IHC) z wykorzystaniem przeciwciała anti-HuC/D (Rycina 3). Na preparatach zmierzono liczbę zwojów, ilość neuronów w zwoju, oraz powierzchnię (pole przekroju) zwoju (Rycina 4).



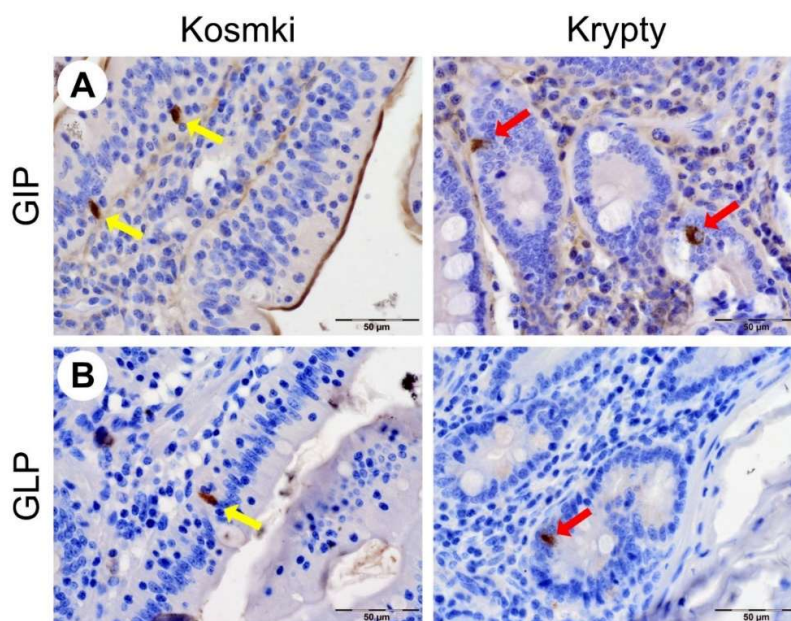
Rycina 3. Reakcja immunohistochemiczna IHC (A) z wykorzystaniem przeciwciała anti-HuC/D w celu oceny zwójów nerwowych (B) mięśniowych i (C) podśluzówkowych.



Rycina 4. Schemat wykonywania pomiarów histomorfometrycznych w obrębie zwójów w celu określenia (A) liczby neuronów oraz (B) pola powierzchni.

Z otrzymanych preparatów IHC, przy użyciu mikroskopu Olympus BX61 (Olympus, Japonia) wyposażonego w aparat cyfrowy (LC35, Olympus, Japonia) oraz oprogramowanie Cell^M 2.3 (Olympus cellSens Standard), wykonano cyfrowe fotomikrografie o wysokiej rozdzielczości (1920x1200 pikseli). Aby zapewnić jednolitość i możliwość porównywania wyników, parametry ekspozycji mikroskopu oraz wykonanych zdjęć zostały ujednolicone dla wszystkich preparatów, w taki sam sposób, by możliwa była wizualna ocena dla wyniku pozytywnego, tj. brązowej barwy pozytywnej reakcji IHC w cytoplazmie (Rycina 5).

Ilościową analizę reakcji IHC dla GIP i GLP przeprowadzono przy użyciu programu ImageJ. Dla całego preparatu (przekroju) dokonano identyfikacji i zliczenia komórek immuno-pozytywnych, zarówno w kosmkach, jak i w kryptach. Wykorzystując narzędzia dostępne w programie ImageJ, zmierzono całkowitą widoczną powierzchnię pola przekroju wszystkich kosmków oraz krypt. Na tej podstawie wyznaczono liczbę komórek immuno-reaktywnych na 1 mm² przekroju zarówno w kosmkach, jak i w kryptach.



Rycina 5. Przykładowe pozytywne reakcje (A) GIP oraz (B) GLP w kosmkach (żółte strzałki) i kryptach (czerwone strzałki).

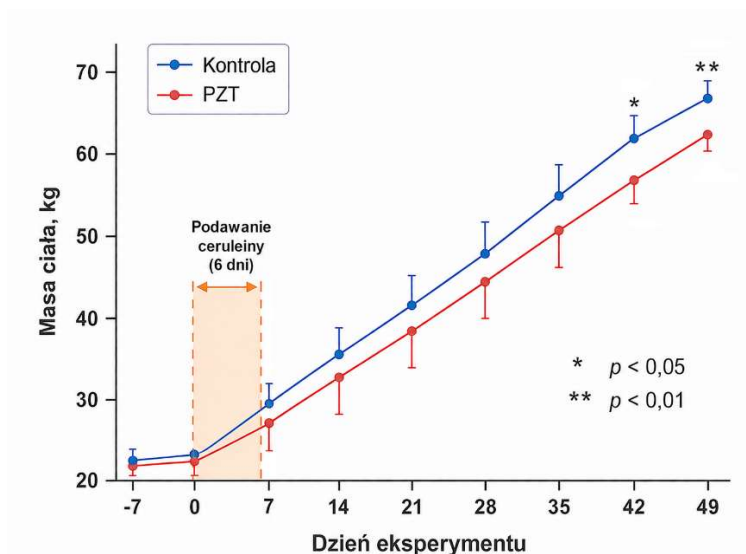
6. ANALIZA STATYSTYCZNA

Wszystkie analizy statystyczne zostały przeprowadzone przy użyciu oprogramowania Statistica PL w wersji 13.1 (TIBCO, USA). We wszystkich analizach za podstawową jednostkę statystyczną przyjęto pojedynczą świnię. Do sprawdzenia, czy dane mają rozkład normalny, zastosowano test Shapiro-Wilka. Homogeniczność wariancji weryfikowano za pomocą testu Levene'a. Zmienne o rozkładzie normalnym analizowano dwustronnym testem t-Studenta lub, jeśli dane o rozkładzie normalnym charakteryzowały się różnymi wariancjami, testem t z poprawką Welcha. W przypadkach, gdy dane nie wykazywały rozkładu normalnego lub homogenicznej wariancji, zastosowano transformację logarytmiczną. Gdy dane po transformacji dalszym ciągu nie spełniały w kryteriów do przeprowadzenia testów parametrycznych, do porównania grup wykorzystano nieparametryczny test U Manna-Whitneya. Poziom istotności statystycznej ustalono na poziomie $\alpha = 0,05$ dla wszystkich testów. Wyniki testów, w których wartości P mieściły się w zakresie od 0,05 do 0,1, uznano za istotne na poziomie tendencji statystycznej, wskazując na istnienie trendu statystycznego. Prezentacja uzyskanych wyników poziomu ekspresji genów obejmuje znormalizowane średnie geometryczne i geometryczny błąd standardowy (GSE), oraz średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe dla pozostałych zmiennych.

7. WYNIKI

1. MASY CIAŁA

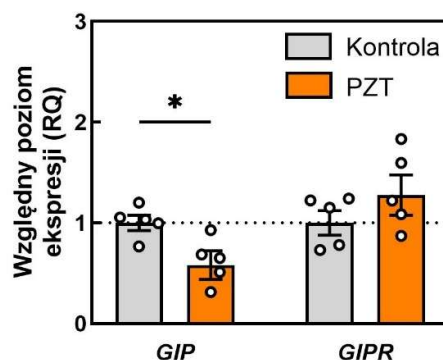
Prosięta zważono przed rozpoczęciem eksperymentu gdy rozdzielono je losowo do grup doświadczalnych (dzień -7), potwierdzając brak istotnych różnic pomiędzy grupami, a następnie pomiary masy ciała wykonywano w odstępach tygodniowych aż do zakończenia eksperymentu i eutanazji zwierząt. W dniu rozpoczęcia eksperymentu (dzień 0) masa ciała prosiąt w grupie kontrolnej wynosiła $23,6 \pm 1,5$ kg, natomiast w grupie PZT z indukowanym przewlekłym zapaleniem trzustki (podawanie ceruleiny) $23,0 \pm 2,1$ kg, w dalszym ciągu bez istotnych różnic pomiędzy grupami. Po zakończeniu podawania ceruleiny masa ciała prosiąt w grupie PZT osiągnęła $26,9 \pm 2,8$ kg i również nie różniła się istotnie od wartości obserwowanych w grupie kontrolnej ($28,9 \pm 1,8$ kg). Brak istotnych różnic w masie ciała utrzymywał się do 5 tygodnia po zakończeniu indukcji zapalenia trzustki. W 42 dniu eksperymentu, odpowiadającym 6 tygodniom od wywołania przewlekłego zapalenia trzustki, masa ciała prosiąt w grupie PZT była istotnie niższa niż w grupie kontrolnej ($55,8 \pm 1,5$ kg vs $59,9 \pm 2,5$ kg; $p < 0,05$). W momencie eutanazji różnica pomiędzy grupami uległa dalszemu zwiększeniu i była wysoce istotna statystycznie ($62,3 \pm 1,3$ kg vs $66,8 \pm 1,2$ kg dla grupy PZT i kontrolnej, odpowiednio; $p < 0,01$) (Rycina 6).



Rycina 6. Zmiany masy ciała zdrowych prosiąt kontrolnych (Kontrola) i prosiąt z grupy doświadczalnej (PZT), u której poprzez podawanie ceruleiny wywołano PZT. Dane przedstawiają wartości średnie i odchylenie standardowe.

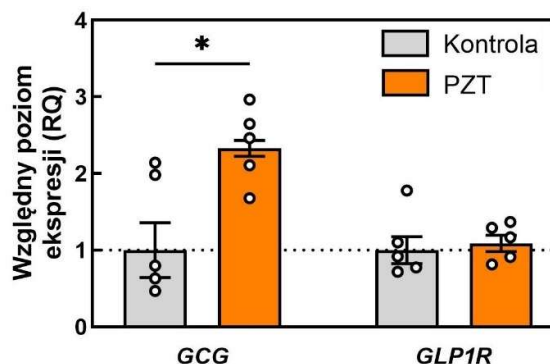
2. EKSPRESJA GENÓW

W grupie PZT względny poziom ekspresji mRNA genu *GIP* był istotnie niższy niż w grupie kontrolnej ($RQ = 0,58$; $FC = 1,72$; $p = 0,016$) (Rycina 7). Nie odnotowano natomiast istotnych zmian w ekspresji mRNA genu receptora *GIPR* ($p > 0,05$).



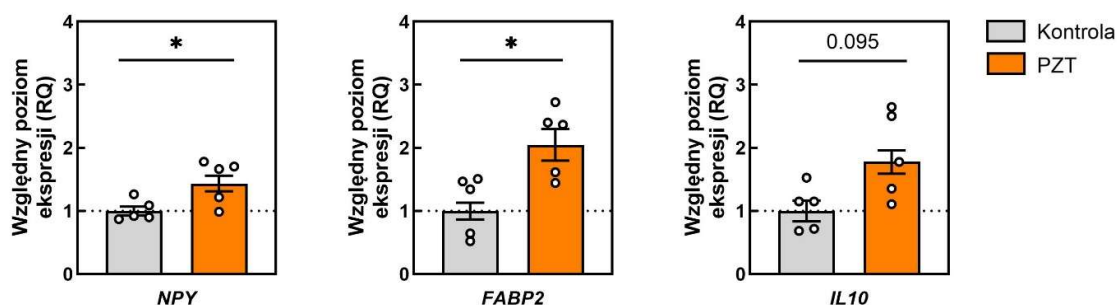
Rycina 7. Względny poziom ekspresji mRNA genów *GIP* i *GIPR* w jelicie czczym świń z grupy kontrolnej i PZT. Dane przedstawiono jako znormalizowane średnie geometryczne $\pm$ geometryczny błąd standardowy GSE. Istotne różnice pomiędzy grupami oznaczono symbolem * ($p < 0,05$). Poszczególne punkty reprezentują wartości uzyskane dla pojedynczych zwierząt.

W grupie PZT względny poziom ekspresji mRNA genu *GCG* kodującego prekursor *GLP-1* był istotnie wyższy niż w grupie kontrolnej ($RQ = 2,33$; $FC = 2,33$; $p = 0,016$) (Rycina 8). Nie stwierdzono istotnych zmian w ekspresji mRNA genu receptora *GLP1R* ($p > 0,05$).



Rycina 8. Względny poziom ekspresji mRNA genów *GCG* i *GLP1R* i w jelicie czczym świń z grupy kontrolnej i PZT. Dane przedstawiono jako znormalizowane średnie geometryczne $\pm$ GSE. Istotne różnice pomiędzy grupami oznaczono symbolem * ($p < 0,05$). Poszczególne punkty reprezentują wartości uzyskane dla pojedynczych zwierząt.

W grupie PZT względny poziom ekspresji mRNA genów *NPY* i *FABP2* był istotnie wyższy niż w grupie kontrolnej (odpowiednio: RQ = 1,44; FC = 1,44; p = 0,040 oraz RQ = 2,05; FC = 2,05; p = 0,032). Dla genu *IL10* nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupami, chociaż odnotowano tendencję do zwiększonej ekspresji (p = 0,095).

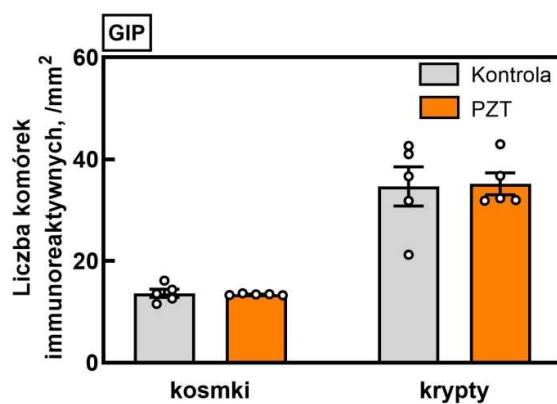
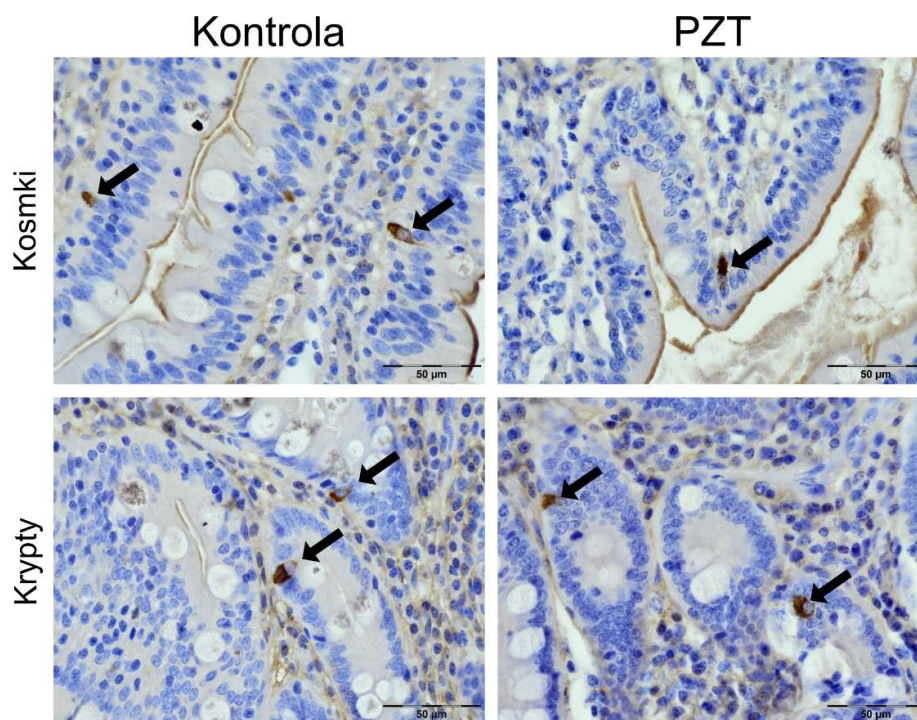


Rycina 9. Względny poziom ekspresji mRNA genów *NPY*, *FABP2* i *IL10* w jelicie czczym świń z grupy kontrolnej i PZT. Dane przedstawiono jako znormalizowane średnie geometryczne $\pm$ GSE. Istotne różnice pomiędzy grupami oznaczono symbolem * (p < 0,05). W przypadku trendów statystycznych (0,05 $\leq$ p < 0,10) podano dokładną wartość p. Poszczególne punkty reprezentują wartości uzyskane dla pojedynczych zwierząt.

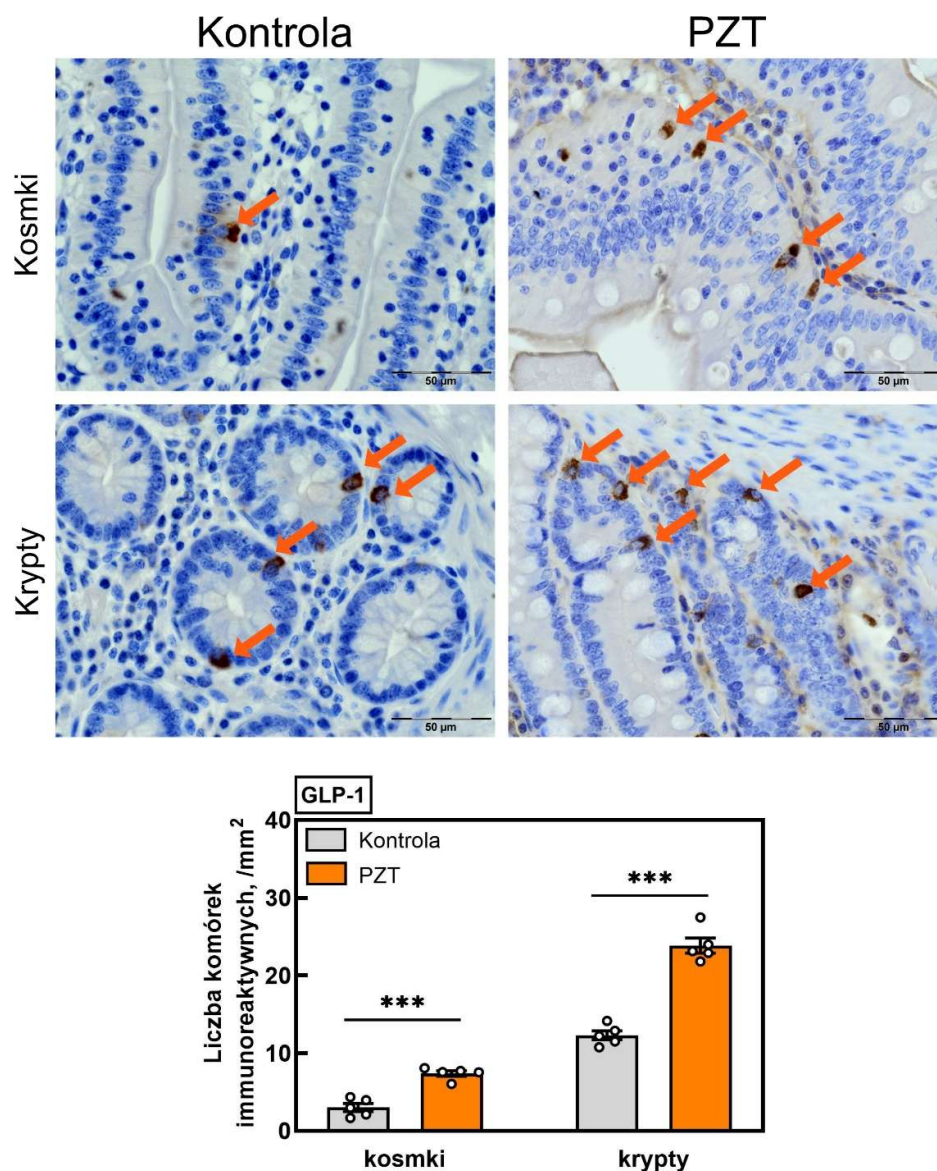
3. KOMÓRKI IMMUNOREAKTYWNE

Nie stwierdzono istotnego wpływu PZT na liczbę komórek immunoreaktywnych względem GIP zarówno w kosmkach, jak i kryptach jelitowych jelita czczego (Rycina 10). Zarówno w obrębie kosmków jelitowych ($13,7 \pm 1,8$ vs. $13,4 \pm 0,2$ n/mm²; p = 0,790), jak i krypt jelitowych ($34,7 \pm 8,6$ vs. $35,2 \pm 4,8$ n/mm²; p = 0,910) nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupą kontrolną i PZT.

W grupie PZT stwierdzono istotny wzrost liczby komórek immunoreaktywnych względem GLP-1 zarówno w obrębie kosmków, jak i krypt jelitowych (Rycina 11). W kosmkach liczba komórek GLP-1-dodatnich była ponad dwukrotnie wyższa niż w grupie kontrolnej ($7,4 \pm 0,8$ vs. $3,0 \pm 1,2$ n/mm²; p < 0,001). Podobny efekt obserwowano w kryptach jelitowych, gdzie liczba komórek immunoreaktywnych względem GLP-1 wzrosła z $12,3 \pm 1,3$ do $23,9 \pm 2,2$ n/mm² (p < 0,001).



Rycina 10. Immunohistochemiczna lokalizacja komórek GIP-dodatnich (strzałki) w kosmkach i kryptach jelitowych jelita czczego świń z grupy kontrolnej i PZT oraz wyniki ilościowej analizy liczby komórek immunoreaktywnych względem GIP. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe. Poszczególne punkty reprezentują wartości uzyskane dla pojedynczych zwierząt. Skala = 50 μ m.



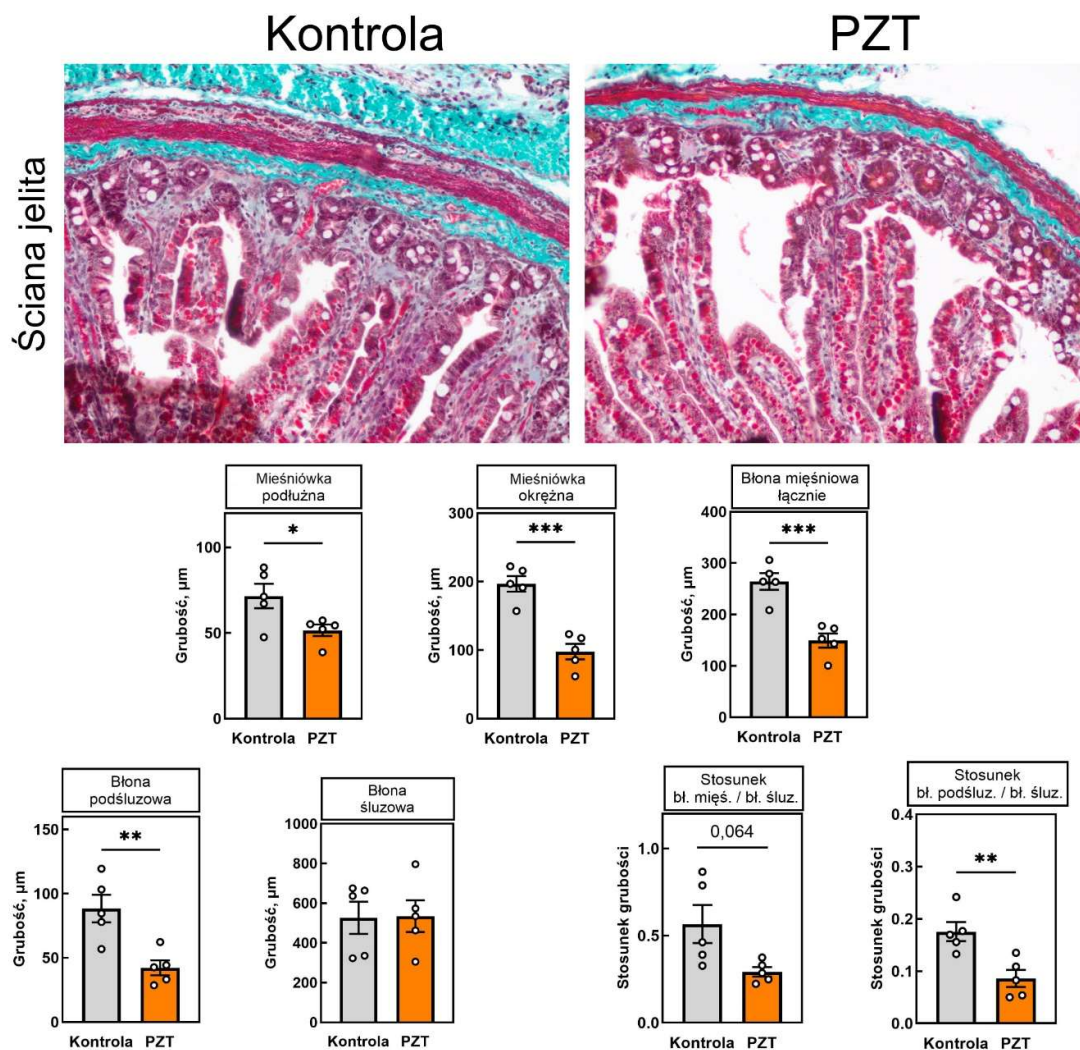
Rycina 11. Immunohistochemiczna lokalizacja komórek GLP-1-dodatnich (strzałki) w kosmkach i kryptach jelitowych jelita czczego świń z grupy kontrolnej i PZT oraz wyniki ilościowej analizy liczby komórek immunoreaktywnych względem GLP-1. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe. Poszczególne punkty reprezentują wartości uzyskane dla pojedynczych zwierząt. Skala = 50 μ m.

4. HISTOMORFOMETRIA ŚCIANY JELITA CZCZEGO

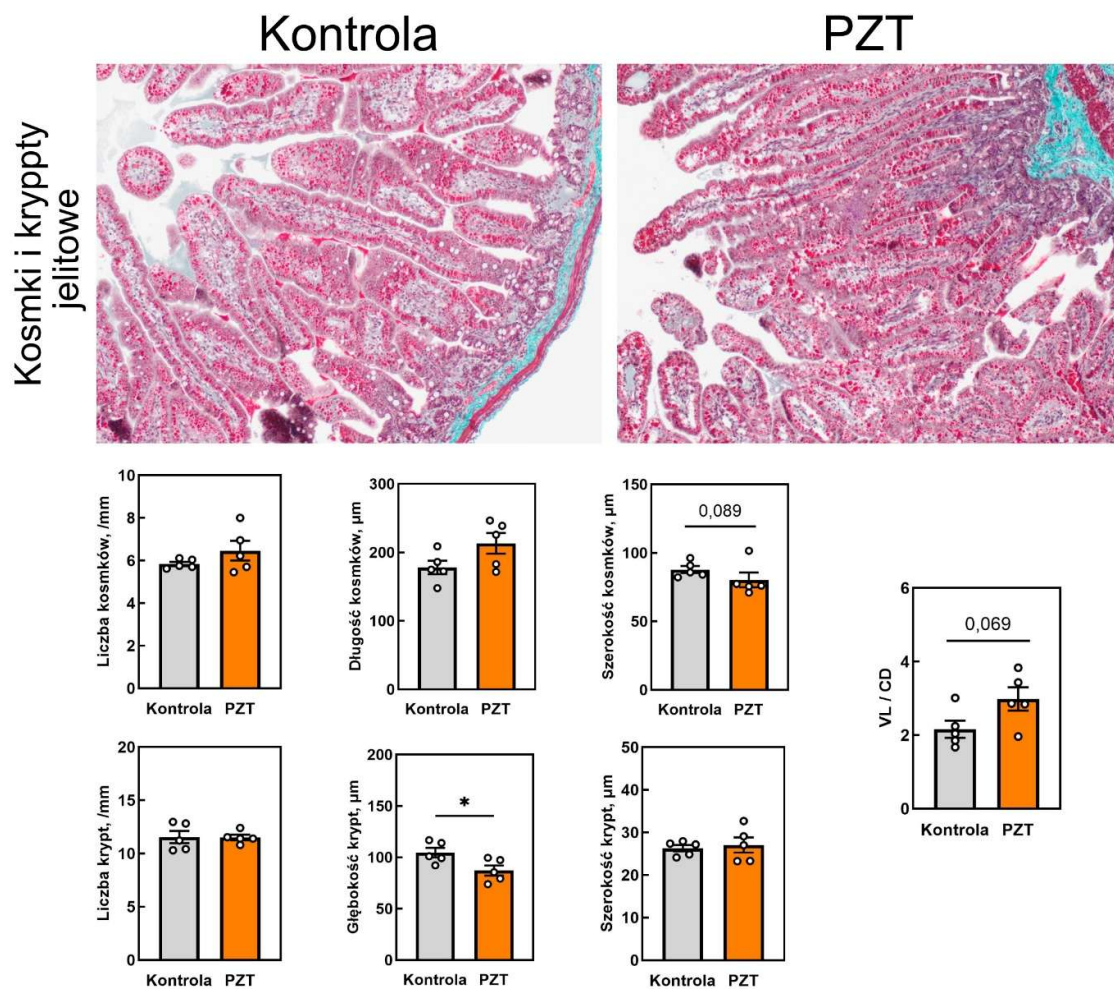
Wyniki analizy histomorfometrycznej ścian jelita czczego przedstawiona na Rycinie 12. Stwierdzono istotne zmniejszenie grubości błony mięśniowej jelita czczego w grupie PZT. Grubość warstwy podłużnej błony mięśniowej była istotnie mniejsza niż w grupie kontrolnej ($51,6 \pm 7,4$ vs. $71,6 \pm 16,0 \mu\text{m}$; $p = 0,035$). Jeszcze wyraźniejsze zmniejszenie odnotowano w przypadku warstwy okrężnej błony mięśniowej ($97,8 \pm 25,0$ vs. $193 \pm 34 \mu\text{m}$; $p < 0,001$). W konsekwencji całkowita grubość błony mięśniowej była istotnie niższa w grupie PZT niż w grupie kontrolnej (149 ± 31 vs. $264 \pm 36 \mu\text{m}$; $p < 0,001$). Istotne zmniejszenie stwierdzono również w obrębie błony podśluzowej, której grubość wynosiła $42,2 \pm 13,0 \mu\text{m}$ w grupie PZT oraz $88,4 \pm 24,0 \mu\text{m}$ w grupie kontrolnej ($p = 0,005$). Nie wykazano natomiast istotnych różnic w grubości błony śluzowej ($p = 0,835$). Analiza wskaźników grubości wykazała istotne obniżenie stosunku grubości błony podśluzowej do błony śluzowej w grupie PZT ($p = 0,006$), natomiast dla stosunku grubości błony mięśniowej do błony śluzowej odnotowano jedynie tendencję (trend) do zmniejszenia ($p = 0,064$).

W grupie PZT odnotowano istotne zmniejszenie głębokości krypt jelitowych (87 ± 11 vs. $105 \pm 10 \mu\text{m}$; $p = 0,033$) (Rycina 12). Tym samym, pomimo różnicy w długości kosmków jelitowych (kontrola: $178 \pm 22 \mu\text{m}$, PZT: 213 ± 23 ; $p = 0,144$) obserwowano tendencję do zwiększenia wartości stosunku długości kosmków do głębokości krypt VL/CD ($2,98 \pm 0,71$ vs. $2,16 \pm 0,52$; $p = 0,069$). Również szerokość kosmków miała tendencję trendową do redukcji (kontrola: $87,9 \pm 5,7 \mu\text{m}$, PZT: $80,3 \pm 12,1 \mu\text{m}$; $p = 0,089$). Pozostałe analizowane parametry morfometryczne kosmków i krypt, w tym ich liczba na długość przekroju jelita, nie różniły się istotnie pomiędzy grupami ($p > 0,05$).

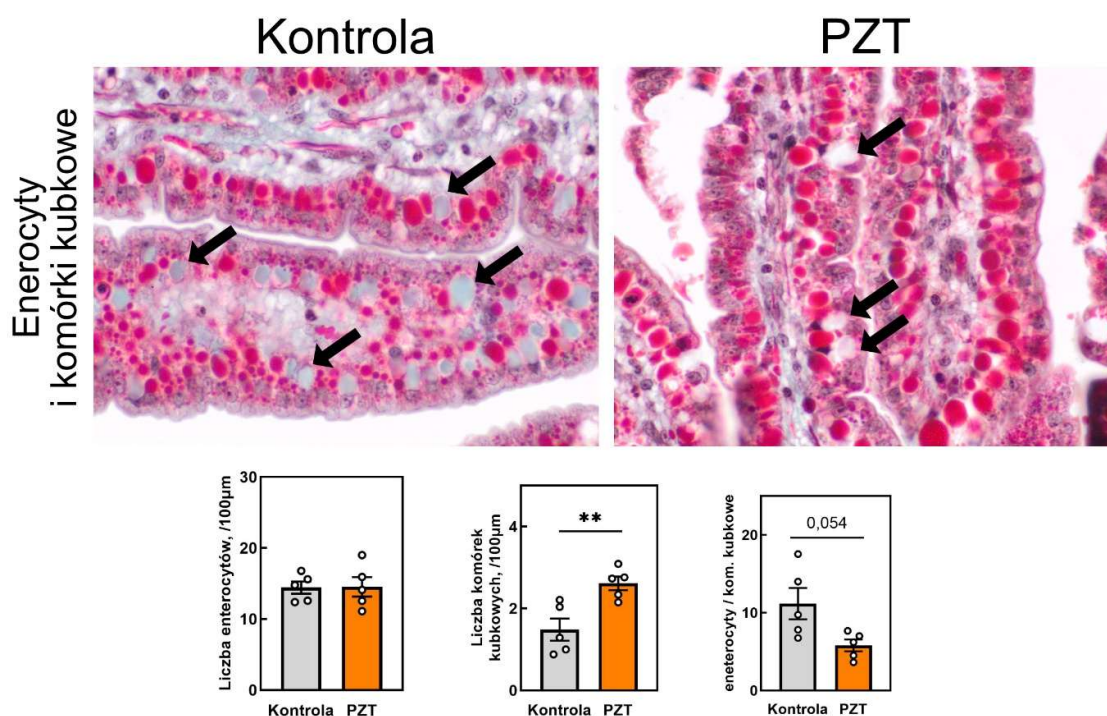
Liczba enterocytów na długości kosmków jelitowych była taka sama w obu grupach ($14,4 \pm 1,9 / 100\mu\text{m}$ vs $14,5 \pm 3,08 / 100\mu\text{m}$, $p > 0,05$), natomiast liczba komórek kubkowych była istotnie większa w grupie PZT niż w grupie kontrolnej i wynosiła (odpowiednio $2,61 \pm 0,37$ oraz $1,48 \pm 0,61 / 100 \mu\text{m}$, $p = 0,007$). Tym samym stosunek liczby enterocytów do komórek kubkowych wykazywał silną tendencję do zmniejszenia w grupie PZT ($11,2 \pm 4,5$ vs $5,81 \pm 1,7$; $p = 0,054$) (Rycina 13).



Rycina 12. Reprezentatywne mikrofotografie ściany jelita czczego świń z grupy kontrolnej i PZT barwione metodą trójkolorową oraz wyniki analizy histomorfometrycznej grubości poszczególnych warstw ściany jelita. Oceniono grubość warstwy podłużnej i okrężnej błony mięśniowej, całkowitą grubość błony mięśniowej, grubość błony podśluzowej i śluzowej oraz stosunek grubości błony mięśniowej do śluzowej i błony podśluzowej do śluzowej. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe. Poszczególne punkty reprezentują wartości uzyskane dla pojedynczych zwierząt. Istotne różnice pomiędzy grupami oznaczono symbolem * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oraz *** ($p < 0,001$). Dla wyników wykazujących tendencję (trend $0,05 \leq p < 0,10$) podano dokładną wartość p. Skala = 100 μm .



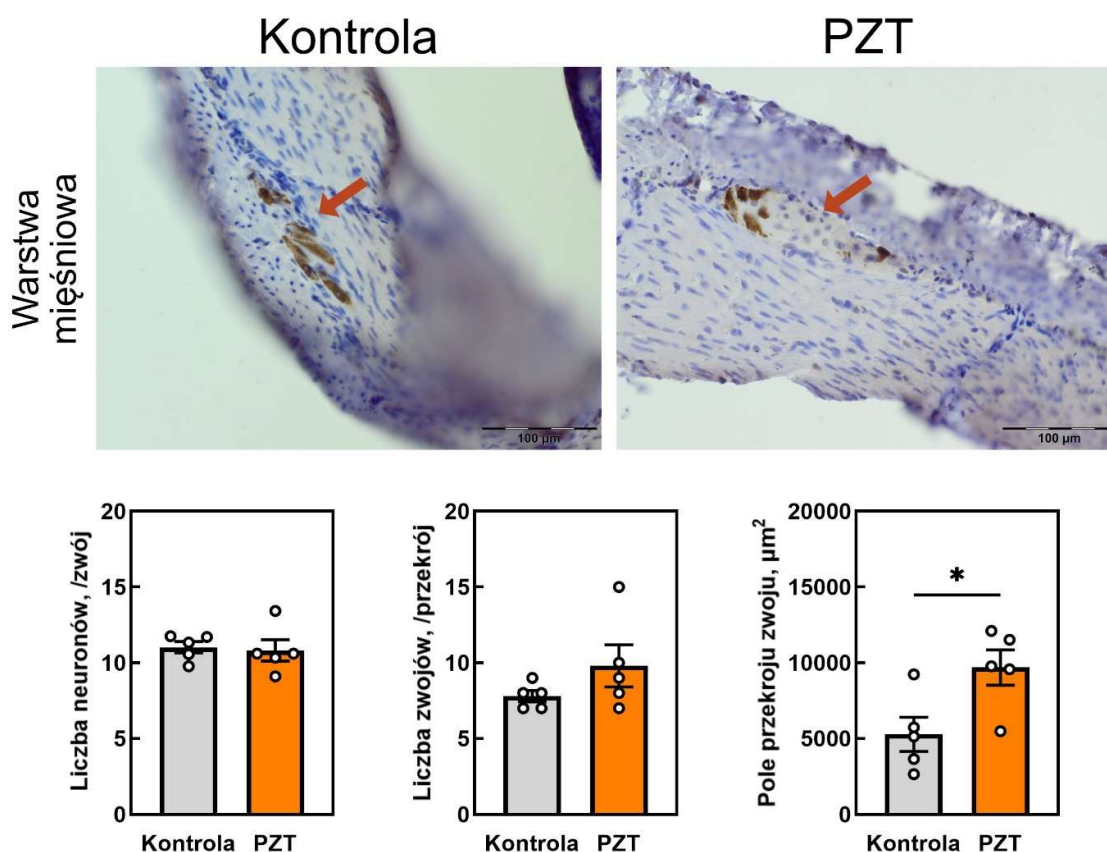
Rycina 13. Reprezentatywne mikrofotografie przekroju jelita czczego świń z grupy kontrolnej i PZT barwione metodą trójkolorową oraz wyniki analizy histomorfometrycznej kosmków i krypt jelitowych. Oceniono liczbę, długość i szerokość kosmków, liczbę, głębokość i szerokość krypt oraz stosunek długości kosmków do głębokości krypt VL/CD. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe. Poszczególne punkty reprezentują wartości uzyskane dla pojedynczych zwierząt. Istotne różnice pomiędzy grupami oznaczono symbolem * ($p < 0,05$). Dla wyników wykazujących tendencję ($\text{trend } 0,05 \leq p < 0,10$) podano dokładną wartość p. Skala = 200 μm .



Rycina 14. Reprezentatywne mikrofotografie kosmków jelitowych świń z grupy kontrolnej i PZT barwionych metodą trójkolorową, przedstawiające enterocyty oraz komórki kubkowe (strzałki), a także wyniki ilościowej analizy liczby enterocytów, liczby komórek kubkowych oraz stosunku liczby enterocytów do liczby komórek kubkowych. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe. Poszczególne punkty reprezentują wartości uzyskane dla pojedynczych zwierząt. Istotne różnice pomiędzy grupami oznaczono symbolem ** ($p < 0,01$). Dla wyników wykazujących tendencję (trend $0,05 \leq p < 0,10$) podano dokładną wartość p . Skala = 50 μm .

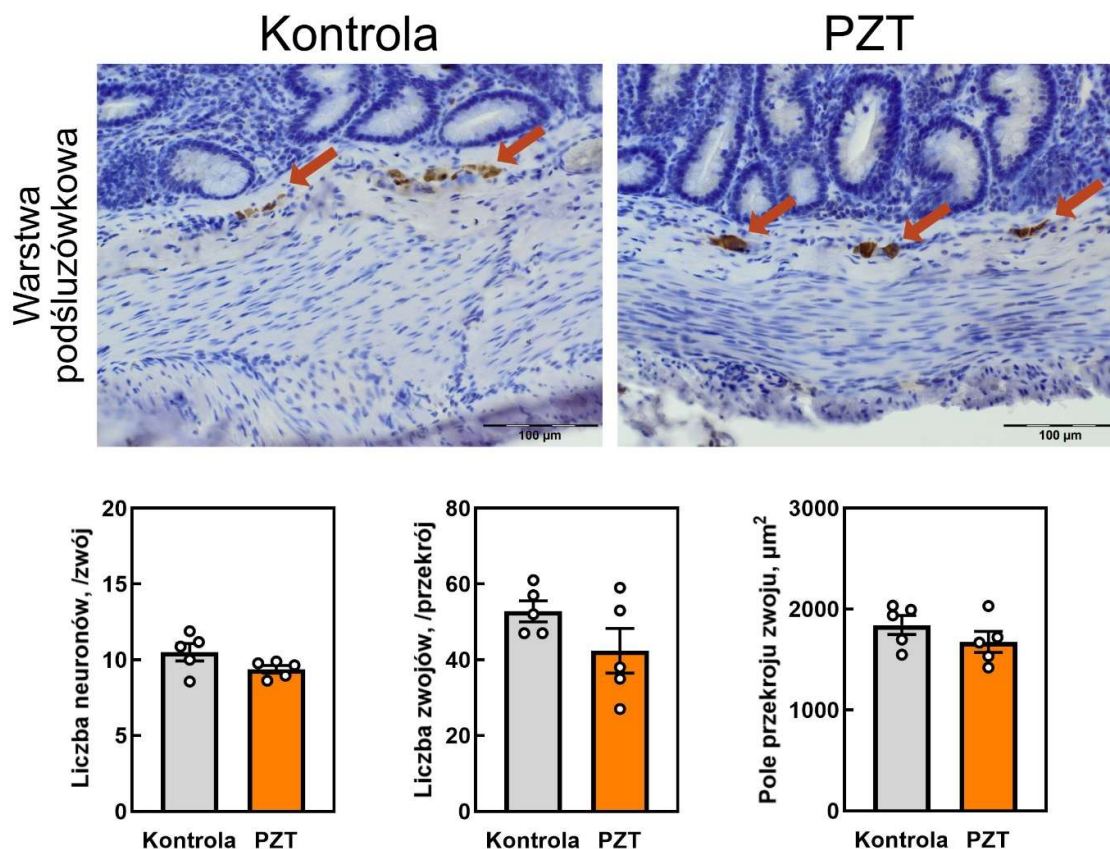
5. ZWOJE MIĘŚNIOWE I PODŚLUZÓWKOWE UKŁADU NERWOWEGO JELITOWEGO

W obrębie zwojów mięśniowych ENS nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupą kontrolną i PZT ani w średniej liczbie neuronów przypadających na pojedynczy zwój ($11,0 \pm 0,8$ vs. $10,8 \pm 1,6$; $p > 0,05$), ani w liczbie zwojów obserwowanych w analizowanym przekroju jelita ($7,8 \pm 0,8$ vs. $9,8 \pm 3,1$; $p > 0,05$) (Rycina 15). Istotnie większe było natomiast pole powierzchni przekroju zwojów mięśniowych w grupie PZT, wynoszące $9692 \pm 2591 \mu\text{m}^2$, wobec $5286 \pm 2521 \mu\text{m}^2$ w grupie kontrolnej ($p = 0,026$).



Rycina 15. Reprezentatywne mikrofotografie zwojów mięśniowych ENS w jelicie czczym świń z grupy kontrolnej i PZT (strzałki) oraz wyniki analizy morfometrycznej obejmującej średnią liczbę neuronów przypadających na zwój, liczbę zwojów w analizowanym przekroju oraz pole powierzchni przekroju zwoju. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe. Poszczególne punkty reprezentują wartości uzyskane dla pojedynczych zwierząt. Istotne różnice pomiędzy grupami oznaczono symbolem * ($p < 0,05$). Skala = 100 μm .

W obrębie zwojów podśluzówkowych ENS nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupą kontrolną i PZT w żadnym z analizowanych parametrów morfometrycznych (Rycina 16). Zarówno liczba zwojów obserwowanych w analizowanym przekroju jelita ($52,8 \pm 6,2$ vs. $42,4 \pm 13,3$; $*p > 0,05$), jak i średnia liczba neuronów przypadających na pojedynczy zwój ($10,5 \pm 1,3$ vs. $9,4 \pm 0,6$; $p > 0,05$) były porównywalne pomiędzy grupami. Nie wykazano również istotnych różnic w polu powierzchni przekroju zwojów podśluzówkowych (1842 ± 210 vs. $1675 \pm 231 \mu\text{m}^2$; $p > 0,05$).



Rycina 16. Reprezentatywne mikrofotografie zwojów podśluzówkowych ENS w jelicie czczym świń z grupy kontrolnej i PZT (strzałki) oraz wyniki analizy morfometrycznej obejmującej średnią liczbę neuronów przypadających na zwój, liczbę zwojów w analizowanym przekroju oraz pole powierzchni przekroju zwojów. Dane przedstawiono jako średnie arytmetyczne $\pm$ odchylenie standardowe. Poszczególne punkty reprezentują wartości uzyskane dla pojedynczych zwierząt. Istotne różnice pomiędzy grupami oznaczono symbolem * ($p < 0,05$). Skala = 100 µm.

8. DYSKUSJA

Uzyskany obraz zmian morfologicznych i molekularnych wskazuje, że jelito cienkie w przebiegu PZT nie jest jedynie narządem wtórnie reagującym na proces chorobowy toczący się w trzustce, lecz podlega złożonej odpowiedzi adaptacyjno-degeneracyjnej. W celu uporządkowania dalszej interpretacji uzyskanych wyników przyjęto robocze rozróżnienie pomiędzy zmianami adaptacyjnymi, degeneracyjnymi oraz niejednoznacznymi. Zmiany adaptacyjne definiowane są jako takie, które potencjalnie kompensują zaburzenia wywołane chorobą trzustki i mogą sprzyjać optymalizacji trawienia, absorpcji lub utrzymaniu integralności bariery jelitowej (Miller & Zachary, 2017). Zmiany degeneracyjne obejmują natomiast modyfikacje odzwierciedlające uszkodzenie strukturalne, proces kataboliczny lub utratę sprawności funkcjonalnej tkanek (Warner, 2016). Do kategorii zmian niejednoznacznych zaliczono parametry, które mogą mieć charakter kompensacyjny, lecz równie prawdopodobnie mogą wynikać z przewlekłego stanu zapalnego, niedożywienia lub ogólnoustrojowej odpowiedzi stresowej. Już na tym etapie widoczny jest więc fenotyp mieszany, w którym komponenty strukturalne i regulacyjne ulegają różnokierunkowej przebudowie. W celu uporządkowania interpretacji poszczególne parametry przyporządkowano do kategorii odpowiadającej najbardziej prawdopodobnemu znaczeniu biologicznemu. Wyniki zebrano w Tabeli 4. Zmiany degeneracyjne w jelicie czczym nie miały charakteru uogólnionej atrofii wszystkich warstw ściany jelita, lecz dotyczyły przede wszystkim ścieńczenia obu warstw mięśniówki, zarówno warstwy okrężnej, jak i podłużnej, oraz podśluzówki, przy zachowaniu całkowitej grubości śluzówki. Taki rozkład zmian sugeruje selektywną przebudowę warstw odpowiedzialnych za motorykę i integrację neurohumoralną, przy względnym zachowaniu strukturalnej integralności śluzówki. Rozdzielenie to stanowi klucz do interpretacji dalszych zależności czynnościowych. Śluzówka jelita cienkiego cechuje się wysoką plastycznością i szybkim tempem wymiany (Barker, 2014; Beumer & Clevers, 2016), natomiast mięśniówka gładka i podśluzówka w większym stopniu odzwierciedlają długotrwały bilans troficzno-kataboliczny oraz wpływ sygnałów neurohumoralnych (Lebrun i in., 2017; Sharkey, 2015).

Tabela 4. Podsumowanie zaobserwowanych zmian

Kategoria interpretacyjna	Obserwowane zmiany	Uzasadnienie interpretacyjne
Najbardziej prawdopodobnie adaptacyjne	↑ liczba komórek kubkowych	Wzmocnienie bariery śluzowej
	↑ mRNA <i>GCG</i>	Aktywacja osi proglukagonowej i potencjalna funkcja barierowo-troficzna
	↑ liczba komórek GLP1 +	
	↑ mRNA <i>IL10</i> (trend)	Komponent przeciwzapalny
Najbardziej prawdopodobnie degeneracyjne	↑ mRNA <i>FABP2</i>	Możliwa adaptacja enterocytów związana ze zmienionym metabolizmem lipidów
	↓ grubość mięśniówki	Efekt kataboliczny
	↓ masa ciała	Utrata masy mięśniowej
	Potencjalna zaburzona perystaltyka	Ogólnoustrojowy stan kataboliczny
Niejednoznaczne	↑ pole powierzchni zwojów mięśniowych	Zaburzenie osi nerwowo-mięśniowej
	↑ mRNA <i>NPY</i>	Przebudowa ENS o niejednoznacznym kierunku funkcjonalnym
	↓ mRNA <i>GIP</i> bez zmiany liczby K-komórek	Możliwa adaptacja hamująca lub odpowiedź związana z przewlekłym stanem zapalnym
		Zmiana fenotypu sekrecyjnego bez utraty populacji

W praktyce klinicznej PZT jest jednostką wysokiego ryzyka niedożywienia i katabolizmu, a aktualne wytyczne podkreślają konieczność wczesnej interwencji żywieniowej (Baron i in., 2020; Dominguez-Munoz i in., 2018). W tym kontekście ścieńczenie mięśniówki w modelu, w którym stwierdzono istotny spadek masy ciała, należy interpretować z uwzględnieniem dwóch nakładających się komponentów: bezpośredniego wpływu procesu zapalnego oraz wtórnego deficytu energetyczno-białkowego (González-González i in., 2019; Löhr i in., 2017). Oznacza to, że obserwowane zmiany głębokich warstw jelita cienkiego nie mogą być jednoznacznie przypisane wyłącznie lokalnemu procesowi zapalnemu i prawdopodobnie odzwierciedlają współwystępowanie mechanizmów miejscowych oraz ogólnoustrojowych.

Należy jednak uwzględnić, że poszczególne parametry oceniane w niniejszym badaniu wykazują różną podatność na efekt kataboliczny. Do parametrów szczególnie wrażliwych na niedożywienie i ogólnoustrojowy stan kataboliczny zalicza się grubość warstw mięśniowych

jelita, masę narządów wewnętrznych, parametry proliferacyjne krypt oraz całkowitą masę ciała zwierząt. Zmiany tego typu mogą w istotnym stopniu odzwierciedlać ubytek substratów energetycznych i wymuszoną przebudowę metaboliczną organizmu. W badaniach prowadzonych u świń wykazano, że ograniczenie podaży paszy prowadzi do spadku masy ciała oraz obniżenia względnej masy narządów, a także do niekorzystnych zmian histomorfometrycznych struktury jelita cienkiego, obejmujących spadek długości kosmków i głębokości krypt (X. Wang i in., 2025). Z kolei w modelach niedożywienia rozwojowego i ograniczenia wzrostu opisywano również ścieńczenie warstwy mięśniowej jelita cienkiego, w tym jelita czczego (Szabó i in., 2023). Zmiany te interpretowane są jako efekt ogólnoustrojowego katabolizmu i adaptacji energetycznej organizmu (Yu i in., 2019). Parametry morfometryczne ściany jelita należą zatem do grupy wskaźników szczególnie podatnych na deficyt substratów energetycznych (X. Wang i in., 2025).

Zmiany te należy rozpatrywać nie tylko w wymiarze strukturalnym, lecz również czynnościowym. W badaniach klinicznych u ludzi z PZT opisywano zaburzenia motoryki jelit oraz zmiany napięcia mięśniówki (Larsen i in., 2022), jednak dane dotyczące bezpośredniej morfometrii ściany jelita pozostają ograniczone (L. Chen i in., 2018; Lindkvist, 2013; Olesen i in., 2011). W modelach zwierzęcych przewlekłej niewydolności trzustki wykazywano zmiany w perystaltyce oraz aktywności mioelektrycznej jelita cienkiego (Hankel i in., 2022; Schubert i in., 2022). Obserwowane w niniejszej pracy ścieńczenie mięśniówki może odzwierciedlać zmiany funkcjonalne opisywane w przebiegu przewlekłych chorób trzustki, jednak zależność ta wymaga bezpośredniego potwierdzenia w badaniach czynnościowych.

W obrębie osi kosmek-krypta zaobserwowano skrócenie krypt przy tendencji do wydłużenia kosmków oraz wzrost liczby komórek kubkowych. Taki układ może wskazywać na reorganizację architektury nabłonka oraz zmianę równowagi pomiędzy strefą proliferacyjną a strefą funkcjonalną kosmka, jednak interpretację tę należy traktować ostrożnie ze względu na brak oceny markerów proliferacji i apoptozy. Zachowanie całkowitej grubości śluzówki przy jednoczesnej zmianie proporcji kosmek-krypta sugeruje utrzymanie ogólnej organizacji warstwy nabłonkowej pomimo jej architektonicznej przebudowy (Beumer & Clevers, 2016). Łącznie obraz ten przemawia raczej za przebudową śluzówki niż za jej klasyczną atrofią (Barker, 2014).

Wzrost liczby komórek kubkowych ma wyraźne znaczenie funkcjonalne. Komórki te stanowią kluczowy element bariery śluzowej, modulując interakcje z mikrobiotą oraz

odpowiedź immunologiczną (Birchenough i in., 2015; Johansson & Hansson, 2016). W modelach ceruleinowego PZT u świń wykazano cechy upośledzenia bariery jelitowej, w tym spadek ekspresji *CDH1* (genu kodującego E-kadherynę) oraz wzrost markerów przepuszczalności (Tomaszewska i in., 2023). Wzrost liczby komórek kubkowych, podwyższona ekspresja *FABP2* oraz trend wzrostu *IL10* w badaniu własnym można interpretować jako odpowiedź kompensacyjną ukierunkowaną na wzmocnienie bariery śluzowej i kontrolę stanu zapalnego. Interpretacja ta wskazuje na aktywację osi ochronnej śluzówki, choć bez bezpośrednich testów szczelności pozostaje hipotezą roboczą.

Wzrost liczby komórek kubkowych ma wyraźne znaczenie funkcjonalne. Komórki te stanowią kluczowy element bariery śluzowej, modulując interakcje z mikrobiotą oraz odpowiedź immunologiczną (Birchenough i in., 2015; Johansson & Hansson, 2016). W modelach ceruleinowego PZT u świń wykazano cechy upośledzenia bariery jelitowej, w tym spadek ekspresji *CDH1* (genu kodującego E-kadherynę) oraz wzrost markerów przepuszczalności (Tomaszewska i in., 2023). Wzrost liczby komórek kubkowych, podwyższona ekspresja *FABP2* oraz trend wzrostu *IL10* obserwowane w badaniu własnym można interpretować jako element odpowiedzi kompensacyjnej ukierunkowanej na ograniczenie skutków zaburzeń bariery jelitowej i kontrolę lokalnej odpowiedzi zapalnej. Interpretacja ta sugeruje aktywację mechanizmów ochronnych śluzówki, jednak wobec braku bezpośredniej oceny szczelności bariery oraz połączeń międzykomórkowych pozostaje hipotezą wymagającą dalszej weryfikacji.

Istotnym punktem odniesienia są dane pochodzące z modeli zewnątrzwydzielniczej niewydolności trzustki (EPI) u świń (Luu i in., 2020). W modelach chirurgicznych EPI wykazywano spadek długości kosmków, głębokości krypt oraz grubości śluzówki i mięśniówki, częściowo odwracalny po suplementacji enzymów trzustkowych (Prykhodko i in., 2014). W badaniu własnym uzyskano zgodność dotyczącą kierunku zmian w mięśniówce oraz skrócenia krypt, natomiast rozbieżności odnosiły się do długości kosmków i grubości śluzówki. Możliwe wyjaśnienia obejmują odmienny charakter badanego modelu, różny stopień zaburzeń funkcji trzustki, odmienną dynamikę procesów adaptacyjnych oraz potencjalny udział osi proglukagonowej. Szczególnie GLP-2, powstający z tego samego prekursora co GLP-1, wykazuje udokumentowane działanie intestinotroficzne i barierowe, co mogłoby sprzyjać utrzymaniu trofiki oraz integralności śluzówki. Rozbieżności pomiędzy wynikami modeli EPI i PZT sugerują zatem, że ceruleinowy model PZT nie odtwarza w pełni fenotypu czystej

niewydolności zewnątrzwydzielniczej, lecz reprezentuje stan pośredni, w którym współistnieją komponenty adaptacyjne i degeneracyjne.

W szerszym ujęciu interpretacja uzyskanych wyników wymaga odniesienia do koncepcji osi trzustka-jelito, obejmującej kilka wzajemnie powiązanych modułów regulacyjnych (Zhang i in., 2023). Poniższe czteromodułowe ujęcie ma charakter koncepcyjny i służy uporządkowaniu potencjalnych zależności biologicznych wynikających z dostępnych danych.

Po pierwsze, moduł intraluminalny: zmiana podaży enzymów trzustkowych, wodorowęglanów oraz dynamiki mieszania treści pokarmowej wpływa na stopień trawienia, pH oraz dostępność produktów trawienia dla receptorów nabłonka i komórek enteroendokrynnych. Nawet umiarkowane zaburzenia funkcji zewnątrzwydzielniczej trzustki mogą prowadzić do zmiany sygnalizacji luminalnej i wtórnej przebudowy nabłonka (Gribble & Reimann, 2016). Moduł ten można traktować jako potencjalny punkt wyjścia dla dalszych zmian zachodzących w osi trzustka-jelito.

Po drugie, moduł mikrobiologiczny: w PZT często obserwuje się zaburzenia mikrobioty oraz zwiększone ryzyko zespołu rozrostu bakteryjnego jelita cienkiego (SIBO). W metaanalizach odsetek SIBO u pacjentów z PZT sięga około 30-40%, co oznacza kilkukrotnie wyższe ryzyko w porównaniu z populacją kontrolną. Dysbioza może modyfikować lokalne środowisko immunologiczne oraz wpływać na strukturę i funkcję nabłonka jelitowego (Schepis i in., 2021; Zhang i in., 2023). W tym ujęciu mikrobiota może działać jako czynnik wzmacniający przebudowę nabłonkową i zaburzenia bariery jelitowej.

Po trzecie, moduł barierowy: dysbioza, endotoksemia i przewlekły stan zapalny sprzyjają zaburzeniom połączeń międzykomórkowych oraz zmianom w warstwie śluzowej. W modelach ceruleinowego PZT u świń wykazano obniżenie ekspresji białek połączeń ścisłych i przylegania oraz wzrost markerów przepuszczalności (Chelakkot i in., 2018; Tomaszewska i in., 2023). Wzrost liczby komórek kubkowych, podwyższona ekspresja FABP2 oraz trend wzrostu IL10 obserwowane w badaniu własnym mogą być interpretowane jako element odpowiedzi kompensacyjnej związanej z utrzymaniem integralności bariery jelitowej. Łącznie obserwacje te są zgodne z hipotezą aktywacji mechanizmów ochronnych śluzówki, jednak ich znaczenie funkcjonalne wymaga dalszej weryfikacji.

Po czwarte, moduł neuroendokrynnny: jelitowy układ nerwowy oraz komórki enteroendokrynnne integrują bodźce chemiczne, mechaniczne i immunologiczne, modulując

motorykę, sekrecję i odpowiedź zapalną. U pacjentów z PZT opisywano zaburzenia motoryki przewodu pokarmowego i wydłużenie pasażu jelitowego, natomiast w niniejszym badaniu stwierdzono zwiększenie pola powierzchni zwojów mięśniowych ENS. Obserwacje te sugerują, że komponent neurogeny może stanowić istotny element fenotypu jelitowego w przebiegu PZT. Na tym poziomie możliwe jest również sprzężenie pomiędzy osiami inkretynową i nerwową, jednak jego znaczenie funkcjonalne pozostaje niewyjaśnione.

Takie czteromodułowe ujęcie pozwala lepiej zrozumieć, dlaczego w badaniu własnym współistnieją cechy adaptacyjne nabłonka z potencjalnie degeneracyjnymi zmianami w warstwach głębokich ściany jelita. Jelito nie reaguje jednowymiarowo, lecz poprzez zintegrowaną odpowiedź strukturalną, metaboliczną i neurogeną. W tym ujęciu obserwowany fenotyp można interpretować jako dynamiczną równowagę pomiędzy mechanizmami kompensacyjnymi a postępującą utratą rezerwy troficznej.

Profil molekularny i immunohistochemiczny jelita czczego w PZT sugeruje przeprogramowanie osi enteroendokrynej związane z przesunięciem sygnałów od K-komórek w kierunku L-komórek. W warstwie molekularnej i immunohistochemicznej uzyskano charakterystyczny, niesymetryczny wzorec obejmujący spadek ekspresji mRNA *GIP* przy braku zmian liczby komórek GIP-dodatnich zarówno w kosmkach, jak i kryptach oraz równoczesny wzrost ekspresji mRNA *GCG* i liczby komórek GLP-1-dodatnich w obu lokalizacjach. Brak istotnych zmian ekspresji *GIPR* i *GLP1R* wskazuje, że dominującym komponentem obserwowanych zmian może być modyfikacja aktywności lub fenotypu komórek wydzielniczych, a nie zmiana ekspresji receptorów. Łącznie wyniki te sugerują przesunięcie równowagi hormonalnej w obrębie nabłonka jelitowego przy względnie stabilnej ekspresji receptorów inkretynowych.

Z fizjologicznego punktu widzenia rozdzielenie efektu na poziomie „liczby komórek immunoreaktywnych” i „poziomu transkryptu” jest zjawiskiem opisywanym w układzie enteroendokrynnym (Egerod i in., 2012; Gribble & Reimann, 2016). Analiza RT-qPCR odzwierciedla sumaryczną ekspresję transkryptu w badanej tkance, a zatem może wykazywać spadek ekspresji na pojedynczą komórkę mimo zachowanej liczebności danej populacji. Z kolei immunohistochemia dostarcza informacji o liczbie komórek i ich rozmieszczeniu, nie pozwala natomiast na ocenę zawartości peptydu ani tempa jego wydzielania. Dodatkowo w warunkach zmienionej sygnalizacji luminalnej oraz działania mediatorów zapalnych komórki enteroendokryne wykazują znaczną plastyczność fenotypową, obejmującą zmiany profilu

transkrypcyjnego bez koniecznej zmiany liczebności populacji (Beumer i in., 2018). Rozbieżność pomiędzy poziomem mRNA a liczbą komórek należy więc interpretować jako przejaw plastyczności funkcjonalnej, a nie jako sprzeczność pomiędzy zastosowanymi metodami badawczymi.

W perspektywie osi trzustka-jelito osłabienie sygnału *GIP* można interpretować jako następstwo zmienionej sygnalizacji luminalnej towarzyszącej chorobie trzustki (Knop i in., 2007). Mechanizmy wydzielania *GIP* są wrażliwe na obecność produktów trawienia w świetle jelita (Gribble & Reimann, 2016), a wykazano również, że suplementacja enzymów trzustkowych może zwiększać odpowiedź inkretynową w stanach niewydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki (Wolfe i in., 2025). Jednocześnie literatura kliniczna wskazuje, że odpowiedź inkretynowa u pacjentów z PZT jest modulowana przez tolerancję glukozy oraz obecność cukrzycy (Müller i in., 2025). W modelu zwierzęcym, bez równoległej oceny glikemii i odpowiedzi poposiłkowej, spadek ekspresji *GIP* należy traktować przede wszystkim jako wskaźnik lokalnej przebudowy osi enteroendokrynej, a nie bezpośredni dowód upośledzenia efektu inkretynowego w znaczeniu klinicznym. Na obecnym etapie interpretacja dotyczy zatem głównie reorganizacji lokalnej osi hormonalnej, a nie systemowej dysfunkcji metabolicznej.

Wzrost aktywności osi proglukagonowej i sygnału GLP-1 w jelicie czczym świń z PZT może mieć kilka potencjalnych wyjaśnień mechanistycznych. Po pierwsze, wydzielanie GLP-1 przez L-komórki podlega regulacji przez bodźce odżywcze oraz liczne szlaki receptorowe obejmujące receptory sprzężone z białkiem G, transportery składników pokarmowych i receptory kwasów żółciowych. W kontekście PZT szczególnie interesująca jest hipoteza zwiększonego bodźca dystalnego, zgodnie z którą część niestrawionych składników pokarmowych, zwłaszcza lipidów, może docierać do bardziej dystalnych odcinków jelita i nasilać sygnalizację enteroendokrynną (Lehmann & Hornby, 2016; Rasoamanana i in., 2012). Hipoteza ta stanowi jedno z możliwych wyjaśnień obserwowanych zmian hormonalnych poprzez modyfikację środowiska luminalnego.

Po drugie, istnieją dane wskazujące, że L-komórki reagują na sygnały bakteryjne i stres bariery (Lebrun i in., 2017). W modelach eksperymentalnych opisywano zdolność L-komórek do reagowania na lipopolisacharyd (LPS) z udziałem mechanizmów zależnych od TLR4 (Grasset i in., 2017; Rastelli i in., 2019). W badaniu własnym równoczesny wzrost ekspresji *FABP2*, liczby komórek kubkowych oraz trend wzrostu ekspresji *IL10* są zgodne z hipotezą, że aktywacja osi proglukagonowej może pełnić funkcję adaptacyjną w warunkach zaburzeń

bariery jelitowej. W tym ujęciu aktywacja osi proglukagonowej może stanowić element programu ochronnego śluzówki.

Po trzecie, wzrost ekspresji *GCG* jest potencjalnym wskaźnikiem aktywacji osi GLP-2. GLP-2 wykazuje silne działanie intestinotroficzne i barierowe w jelicie cienkim (Drucker & Yusta, 2014; Moran i in., 2012; Ren i in., 2018). Mimo że nie oznaczano GLP-2, kierunek zmian obserwowanych w niniejszym badaniu, obejmujący wzrost ekspresji *GCG*, brak zmian ekspresji receptorów oraz przebudowę osi kosmek-krypta, pozostaje zgodny z hipotezą wspierania trofiki i integralności śluzówki przez sygnały proglukagonowe. Należy jednak podkreślić, że bez bezpośrednich oznaczeń GLP-2 interpretacja ta pozostaje hipotezą funkcjonalną

Warto również uwzględnić, że GLP-1 wpływa na funkcje motoryczne przewodu pokarmowego (Jalleh i in., 2024). W badaniu własnym, przy równoległym przebudowaniu mięśniówki i ENS, wzrost aktywności osi GLP może potencjalnie uczestniczyć w regulacji funkcji motorycznych przewodu pokarmowego w warunkach zaburzonej funkcji trzustki. Oznacza to, że oś inkretynowa i komponent neuromotoryczny mogą pozostawać w funkcjonalnym sprzężeniu, choć zależność ta nie została bezpośrednio zweryfikowana.

Sygnatura molekularna obejmuje ponadto wzrost ekspresji *NPY*, wzrost ekspresji *FABP2* oraz trend wzrostu ekspresji *IL10*. Wzrost ekspresji *NPY* przy jednoczesnym zwiększeniu pola zwojów mięśniowych ENS jest zgodny z koncepcją neuroplastyczności rozwijającej się w warunkach przewlekłego stresu zapalnego i metabolicznego (Knauf i in., 2020). Trend wzrostu ekspresji *IL10*, zestawiony ze wzrostem liczby komórek kubkowych, jest zgodny z uruchomieniem mechanizmów przeciwzapalnych i ochronnych w obrębie śluzówki. Łącznie obserwacje te sugerują współwystępowanie aktywacji komponentu neurogennego i immunomodulacyjnego.

Wzrost ekspresji mRNA *FABP2* można interpretować dwojako: jako adaptację enterocytów do zmienionego metabolizmu lipidów lub jako wskaźnik mikrouszkodzenia nabłonka. Ponieważ oceniano ekspresję *FABP2* na poziomie mRNA w tkance, najbardziej ostrożna interpretacja wskazuje na zwiększoną aktywność enterocytów w zakresie metabolizmu lipidów i/lub odpowiedzi na stres bariery. Rozstrzygnięcie charakteru tej zmiany wymagałoby badań funkcjonalnych bariery jelitowej.

W tym miejscu można wskazać potencjalne powiązania koncepcyjne bez traktowania ich jako dowodów przyczynowych. Wzrost liczby komórek kubkowych oraz trend wzrostu ekspresji *IL10* są zgodne z aktywacją mechanizmów wzmacniających barierę śluzową (Gustafsson & Johansson, 2022; Papoutsopoulou i in., 2021), natomiast wzrost sygnału proglukagonowego może pozostawać z nimi funkcjonalnie związany poprzez działanie GLP-2 (Huang i in., 2023). Równoległe zmiany w mięśniówce i ENS wskazują na obecność komponentu neuromotorycznego, który potencjalnie może wpływać na warunki luminalne i wtórnie modulować aktywność komórek enteroendokrynnych. Ujęcie to pozwala rozpatrywać obserwowane zmiany hormonalne, barierowe i nerwowe jako elementy wspólnej odpowiedzi adaptacyjnej jelita na przewlekły proces chorobowy.

Tak zarysowane przeprogramowanie osi enteroendokrynniej nie może być rozpatrywane w izolacji, ponieważ komórki K i L funkcjonują w ścisłym powiązaniu z jelitowym układem nerwowym. W tym kontekście istotne pozostaje pytanie, czy obserwowane zmiany są wyłącznie odpowiedzią na zmienione bodźce luminalne, czy też stanowią element szerszej przebudowy osi neuroendokrynniej jelita w przebiegu PZT. Uzyskane wyniki wskazują, że oba mechanizmy mogą współwystępować, jednak ich względny udział nie może zostać rozstrzygnięty na podstawie obecnych danych i wymaga dalszych badań czynnościowych.

Ponadto, w analizie osi inkretynowej konieczne jest rozróżnienie dwóch poziomów interpretacji. Poziom lokalny dotyczy zmian zachodzących bezpośrednio w obrębie ściany jelita, obejmujących modyfikację ekspresji mRNA hormonów, zmianę liczby komórek enteroendokrynnych oraz przebudowę ich fenotypu wydzielniczego. W tym ujęciu niniejsze wyniki jednoznacznie wskazują na przesunięcie równowagi w kierunku osi proglukagonowej oraz modyfikację sygnalizacji inkretynowej w jelicie czczym.

Poziom systemowy odnosi się natomiast do efektu inkretynowego w znaczeniu metabolicznym, obejmującego regulację glikemii, sekrecję insuliny oraz interakcję z częścią wewnątrzwydzielniczą trzustki. Wnioskowanie w tym zakresie wymagałoby oceny glikemii, odpowiedzi poposiłkowej oraz oznaczeń stężenia hormonów w osoczu, które nie były przedmiotem niniejszego badania.

Obecne wyniki dokumentują przebudowę lokalnej osi enteroendokrynniej jelita czczego, natomiast nie pozwalają na wnioskowanie o systemowym efekcie inkretynowym w znaczeniu metabolicznym.

Wyniki dotyczące ENS wskazują na wyraźnie selektywną przebudowę zwoju mięśniowego. W grupie PZT wykazano istotny wzrost pola przekroju zwojów mięśniowych, przy braku istotnych różnic w liczbie zwojów, liczbie neuronów na zwoj oraz w parametrach liniowych pojedynczych zwojów. Równocześnie nie stwierdzono istotnych zmian liczbowych ani wymiarowych w obrębie zwojów podśluzówkowych. Łącznie wzorzec ten wskazuje na remodeling komponentu neuromięśniowego bez cech uogólnionej przebudowy całego ENS.

Taki fenotyp jest zgodny z nowoczesnym rozumieniem ENS jako struktury wykazującej plastyczność nie tylko poprzez zmianę liczby neuronów, ale przede wszystkim poprzez przebudowę neuropilu, rozrost i aktywację komórek glejowych jelitowych, zmiany w macierzy zewnątrzkomórkowej oraz nasilone interakcje neuroimmunologiczne (Carbone, 2022; Chanpong i in., 2022; Luo i in., 2025). Wzrost pola zwoju mięśniowego przy stabilnej liczbie neuronów nie musi oznaczać neurogenezy, lecz może odzwierciedlać:

- przerost włókien i reorganizację drzew dendrytycznych,
- gliozę i proliferację gleju jelitowego,
- zmiany w macierzy zewnątrzkomórkowej lub naciek zapalny,
- efekt geometryczny wynikający ze ścieńczenia warstw mięśniowych i zmiany relacji przestrzennych zwoju do otaczających tkanek.

W praktyce oznacza to, że obserwowany wzrost pola zwoju jest bardziej prawdopodobnym markerem przebudowy mikrostrukturalnej niż wskaźnikiem zwiększenia liczby neuronów (Dowling i in., 2022; Frieling, 2024; Mawe i in., 2023).

Zjawiska remodelingu neurochemicznego i strukturalnego ENS są dobrze opisane w stanach zapalnych jelit (Sunardi & Cirillo, 2023), gdzie równolegle obserwuje się zmiany kodowania neuroprzekaźników oraz nasilone interakcje z układem odpornościowym (Wallrapp & Chiu, 2024). Choć PZT nie jest pierwotną chorobą jelita, coraz więcej danych wskazuje, że przewlekłe pankreatopatie mogą indukować wtórne sygnały zapalne i barierowe w przewodzie pokarmowym (Jankowski i in., 2025). W modelu ceruleinowym u rosnących świń opisano cechy zapalenia jelit i uszkodzenia bariery w dwunastnicy (Tomaszewska i in., 2023), co stanowi biologicznie wiarygodny kontekst dla obserwowanej przebudowy zwoju mięśniowego w jelicie czczym. Tym samym remodeling ENS można interpretować jako zjawisko potencjalnie związane ze zmianami zapalnymi i barierowymi zachodzącymi w jelicie, choć kierunek tych zależności nie może zostać jednoznacznie określony na podstawie obecnych danych.

Funkcjonalnie zwój mięśniowy stanowi główny regulator perystaltyki i wzorców motorycznych, podczas gdy zwój podśluzówkowy silniej wiąże się z kontrolą sekrecji, przepływu krwi i funkcji śluzówki. Brak zmian w zwoju podśluzówkowym, przy jednoczesnym braku różnic w grubości śluzówki, sugeruje względną przewagę zmian o charakterze neuromięśniowym nad zmianami neurosekrecyjnymi. Jednocześnie wzrost liczby komórek kubkowych i modyfikacje osi barierowej wskazują, że komponent nabłonkowo-immunologiczny może ulegać przebudowie względnie niezależnie od zmian w zwoju podśluzówkowym, co jest zgodne z dominującym wpływem bodźców luminalnych i sygnałów zapalnych. Podsumowując, dane te sugerują, że odpowiedź barierowa i przebudowa ENS nie zachodzą równolegle we wszystkich komponentach ściany jelita, a obserwowane zmiany wydają się koncentrować przede wszystkim w osi nerwowo-mięśniowej.

Włączenie do obrazu wzrostu ekspresji *NPY* dodatkowo wzmacnia interpretację w kierunku remodelingu neurochemicznego. Neuropeptyd Y (*NPY*) jest istotnym neuromodulatorem obecnym w ENS, uczestniczącym w regulacji motoryki, sekrecji i odpowiedzi immunologicznej przewodu pokarmowego (Abot i in., 2018). W badaniach klinicznych u pacjentów z PZT opisywano wydłużenie czasu pasażu jelitowego, szczególnie w obrębie jelita cienkiego. W tym kontekście zestaw zmian obserwowanych w badaniu własnym, obejmujący ścieńczenie mięśniówki, wzrost pola zwoju mięśniowego oraz wzrost ekspresji *NPY*, można interpretować jako zespół zmian zgodnych z hipotezą zaburzonej regulacji motorycznej jelita czczego w przebiegu PZT. Nie stanowi to bezpośredniego dowodu funkcjonalnego, lecz tworzy biologicznie spójną hipotezę wymagającą weryfikacji w badaniach czynnościowych. Kluczowe pozostaje rozróżnienie pomiędzy zgodnością biologiczną obserwacji a ich bezpośrednim potwierdzeniem funkcjonalnym.

Z praktycznego punktu widzenia można rozważyć dwa niewykluczające się scenariusze. W ujęciu adaptacyjnym przebudowa zwoju mięśniowego i nasilenie sygnalizacji hamującej mogą prowadzić do spowolnienia pasażu i wydłużenia czasu kontaktu treści pokarmowej z nabłonkiem, co kompensowałoby zaburzone trawienie w przebiegu PZT. W ujęciu degeneracyjnym pierwotny ubytek mięśniówki związany z katabolizmem i przewlekłym stanem zapalnym mógłby wtórnie wywoływać reorganizację ENS, która ma charakter kompensacyjny, lecz niewystarczający do utrzymania prawidłowej motoryki. W innych przewlekłych chorobach GIT sugerowano, że zaburzenia osi nerwowo-mięśniowej mogą poprzedzać lub współistnieć z zanikiem mięśniówki i włóknieniem, co stanowi istotną analogię

biologiczną dla interpretacji obecnych wyników (Feng i in., 2026; Jamka & Gulbransen, 2025). Oba scenariusze prowadzą do podobnej konsekwencji fenotypowej, ale różnią się kierunkiem przyczynowości, którego nie da się rozstrzygnąć w badaniu przekrojowym.

Model ceruleinowy u świń ma istotną wartość translacyjną ze względu na podobieństwa anatomiczne i fizjologiczne do człowieka, jednak jego interpretacja wymaga ostrożności. Fenotyp PZT u świń bywa umiarkowany, bez jawnej steatorrhei czy wyraźnych objawów bólowych, co może oznaczać, że komponenta ciężkiej niewydolności zewnątrz wydzielniczej jest ograniczona. Niewielka liczebność grup ($n = 5$) oraz pojedynczy punkt czasowy ograniczają możliwość analizy dynamiki zmian i rozdzielenia wpływu bezpośredniego działania ceruleiny od następstw przewlekłego procesu i spadku masy ciała. Brak bezpośrednich miar funkcjonalnych jelita, takich jak testy przepuszczalności, ocena tight junctions, analiza pasażu czy mikrobioty, sprawia, że część interpretacji ma charakter mechanistyczny. Ograniczenia te dotyczą przede wszystkim wnioskowania o sekwencji zdarzeń i funkcjonalnej skali zmian.

Jednocześnie uzyskany obraz, obejmujący przebudowę warstw głębokich ściany jelita, zmianę profilu enteroendokrynnego, odpowiedź barierową oraz remodeling ENS, wpisuje się w nowoczesną koncepcję osi narząd-mikrobiota-bariera-układ neuroendokrynnny w chorobach trzustki (Ammer-Herrmenau i in., 2024; Hong i in., 2024; Liu i in., 2023). W świetle wytycznych klinicznych podkreślających znaczenie leczenia niewydolności zewnątrzwydzielniczej, optymalizacji żywienia oraz diagnostyki współistniejących zaburzeń, wyniki te sugerują, że jelito czcze może stanowić istotny, choć często niedoceniany element patofizjologii PZT. W tym ujęciu jelito czcze nie stanowi wyłącznie narządu wtórnie podlegającego zmianom wywołanym przez chorobę trzustki, lecz jest częścią złożonego układu wzajemnych zależności obejmującego funkcje trawienne, barierowe, neuroendokrynnne i immunologiczne.

W przeciwieństwie do parametrów morfometrycznych ściany jelita, liczebność populacji komórek enteroendokrynnych oraz wybrane cechy organizacji ENS uważa się za mniej bezpośrednio zależne od krótkotrwałych zmian bilansu energetycznego. Oznacza to, że część obserwowanych zmian, zwłaszcza w obrębie osi enteroendokrynnnej i ENS, nie może być w sposób jednoznaczny wyjaśniona wyłącznie spadkiem masy ciała. Wydaje się zatem mało prawdopodobne, aby sam efekt niedożywienia w pełni tłumaczył selektywną przebudowę osi proglukagonowej oraz zmiany obserwowane w ENS. Bardziej prawdopodobne jest, że spadek

masy ciała współwystępował z procesami związanymi bezpośrednio z przebiegiem PZT, modulując ich nasilenie, lecz nie stanowiąc jedyne mechanizmu odpowiedzialnego za obserwowany fenotyp jelitowy.

Całościowo obserwowany fenotyp ENS, rozpatrywany łącznie ze zmianami mięśniówki, osi enteroendokrynej i bariery śluzowej, jest zgodny z koncepcją zintegrowanej przebudowy osi neuro-mięśniowo-bariery jelita w przebiegu PZT. W takim ujęciu zmiany zachodzące w poszczególnych komponentach ściany jelita nie stanowią niezależnych zjawisk, lecz elementy wielopoziomowej odpowiedzi obejmującej mechanizmy strukturalne, neurogenne, hormonalne i immunologiczne. Interpretacja ta stanowi rozwinięcie modelu mieszanego, w którym komponenty adaptacyjne i degeneracyjne współlistnieją oraz wzajemnie wpływają na ostateczny fenotyp jelitowy.

Końcowy obraz obserwowanych zmian ma charakter wieloczynnikowy i nie jest w pełni wyjaśniany przez pojedynczy mechanizm patogenetyczny. Bardziej prawdopodobne jest współdziałanie procesów związanych z zaburzoną funkcją trzustki, zmianami środowiska luminalnego, odpowiedzią barierową, przebudową enteroendokrynną oraz remodelowaniem ENS.

W warunkach stresu metabolicznego odpowiedź enteroendokrynną nie ulega jednoznacznemu zahamowaniu. W modelach restrykcji kalorycznej obserwowano utrzymanie, a nawet wzrost aktywności osi proglukagonowej, interpretowane jako element adaptacji metabolicznej. Wskazuje to, że zmiany w populacji komórek L oraz ekspresji *GCG* nie muszą być prostą konsekwencją niedoboru energii. Chociaż efekt kataboliczny mógł częściowo wpływać na parametry morfometryczne ściany jelita, nie wydaje się wystarczający do wyjaśnienia selektywnej przebudowy osi enteroendokrynej obserwowanej w niniejszym badaniu.

6. OGRANICZENIA, TRANSLACYJNOŚĆ I KIERUNKI DAJSZYCH BADAŃ

Najważniejsze ograniczenia interpretacyjne niniejszej pracy wynikają z konstrukcji modelu oraz zakresu zastosowanego panelu funkcjonalnego. Po pierwsze, niewielka liczebność grup ($n = 5$) oraz analiza w jednym punkcie czasowym ograniczają możliwość wnioskowania o dynamice zmian i o sekwencji zdarzeń w osi trzustka-jelito. Uzyskany obraz ma charakter przekrojowy i nie pozwala jednoznacznie rozstrzygnąć, które elementy przebudowy są pierwotne, a które wtórne.

Po drugie, zakończenie eksperymentu po stwierdzeniu istotnego spadku masy ciała w grupie PZT zwiększa ryzyko nakładania się dwóch czynników: bezpośredniego efektu przewlekłego zapalenia trzustki oraz wtórnego wpływu niedożywienia i katabolizmu na strukturę jelita, zwłaszcza na grubość mięśniówki. Rozdzielenie tych komponentów wymagałoby kontrolowanego modelu żywieniowego lub dodatkowych wskaźników stanu odżywienia.

Po trzecie, w badaniu nie raportowano bezpośrednich testów funkcji zewnątrzwydzielniczej trzustki ani wskaźników malabsorpcji, takich jak elastaza w kale czy współczynnik absorpcji tłuszczu, co utrudnia jednoznaczne przyporządkowanie obserwowanych zmian jelitowych do czystej maldigestii. Fenotyp ceruleinowego PZT u świń bywa umiarkowany, bez jawnej steatorrhei czy wyraźnych objawów bólowych, co może oznaczać, że komponent ciężkiej niewydolności zewnątrzwydzielniczej jest w tym modelu ograniczony lub zmienny.

Po czwarte, panel markerów jelitowych nie obejmował bezpośrednich wskaźników szczelności bariery (białek połączeń ścisłych, testów przepuszczalności), analizy mikrobioty ani oceny obecności SIBO, mimo że literatura wskazuje, iż elementy te stanowią istotne komponenty fenotypu jelitowego w PZT. Również w osi enteroendokrynej zakres oznaczeń był selektywny: oceniono dwa hormony w IHC (GIP i GLP-1) oraz wybrane transkrypty, lecz nie analizowano stężeń peptydów w osoczu ani innych istotnych osi regulacyjnych jelita czczego, takich jak PYY, CCK czy somatostatyna. Ogranicza to możliwość pełnej charakterystyki profilu enteroendokrynnego. Ponadto ocena ENS ograniczała się do analizy morfometrycznej zwojów oraz liczby neuronów. Nie analizowano markerów gleju jelitowego, profilu neurochemicznego neuronów ani funkcjonalnych wskaźników aktywności ENS. W konsekwencji obserwowany wzrost pola powierzchni zwojów mięśniowych może być interpretowany jedynie jako pośredni wskaźnik przebudowy strukturalnej, bez możliwości jednoznacznego określenia jej podłoża komórkowego i znaczenia czynnościowego.

Mimo powyższych ograniczeń translacyjność uzyskanych wyników pozostaje wysoka. Świnia stanowi model o istotnych podobieństwach anatomicznych i fizjologicznych do człowieka, a jednocześnie umożliwia bezpośrednią analizę tkanek i zależności strukturalnych w sposób niemożliwy do przeprowadzenia w rutynowej praktyce klinicznej. Uzyskany obraz, obejmujący przebudowę warstw głębokich ściany jelita, zmianę profilu enteroendokrynnego,

odpowiedź barierową oraz remodeling ENS, wpisuje się w nowoczesną koncepcję osi narząd-mikrobiota-bariera-układ neuroendokrynnny w chorobach trzustki.

Z punktu widzenia klinicznego wyniki te sugerują, że zaburzenia przewodu pokarmowego w PZT mogą wykraczać poza prosty deficyt enzymów trzustkowych i obejmować również komponent motoryczny, barierowy oraz enteroendokrynnny. Jelito czcze może zatem stanowić istotny, choć często niedoceniany element patofizjologii PZT.

W kontekście dalszych badań doświadczalnych najbardziej uzasadnione kierunki obejmują:

1. ocenę, czy suplementacja enzymów trzustkowych modyfikuje fenotyp jelita czczego oraz zakres obserwowanej przebudowy strukturalnej i molekularnej;
2. równoległe monitorowanie pasażu jelitowego i funkcji motorycznej jelita cienkiego;
3. analizę mikrobioty oraz ocenę obecności SIBO, ze względu na potencjalne powiązania tych zaburzeń z funkcją bariery i motoryką;
4. rozszerzenie panelu markerów barierowych o ocenę białek połączeń ścisłych, testy przepuszczalności oraz oznaczenia białkowe FABP2/I-FABP w celu rozróżnienia adaptacji metabolicznej enterocytów od ich uszkodzenia;
5. pogłębienie analizy ENS o markery gleju jelitowego oraz pełniejszy profil neurochemiczny (np. nNOS, ChAT, VIP), zgodnie ze współczesnym rozumieniem neuroplastyczności i interakcji neuroimmunologicznych w przewodzie pokarmowym.

Całościowo obserwowany fenotyp, obejmujący zmiany w mięśniówce, osi enteroendokrynnnej, barierze śluzowej oraz ENS, jest zgodny z koncepcją zintegrowanej przebudowy osi neuro-mięśniowo-barierowej jelita w przebiegu PZT. Ujęcie to rozwija model mieszany zaproponowany w niniejszej pracy, w którym komponenty adaptacyjne i degeneracyjne współistnieją oraz wzajemnie wpływają na ostateczny fenotyp jelitowy.

Dla syntetycznego porównania wyników własnych z literaturą przygotowano zestawienie, które przedstawia Tabela 5.

Tabela 5. Zestawienie wyników własnych z kluczowymi danymi literaturowymi

Obserwacja	Zgodność / rozbieżność z literaturą	Interpretacja mechanistyczna
↓ mRNA <i>GIP</i> przy braku zmian liczby komórek GIP+	Zgodne z danymi, że ekspresja i sekrecja GIP zależą od bodźców luminalnych i mogą zmieniać się bez zmiany liczby komórek	Spadek ekspresji „na komórkę”; modulacja przez zmienione trawienie, pasaż i środowisko zapalne; brak danych funkcjonalnych ogranicza wnioskowanie metaboliczne
↑ mRNA <i>GCG</i> ↑ liczby komórek GLP-1 +	Zgodne z aktywacją L-komórek przez bodźce odżywcze, zapalne i sygnały mikrobiologiczne	Przebudowa osi proglukagonowej; możliwa równoległa aktywacja GLP-2 wspierająca barierę i odżywianie? śluzówki
↑ mRNA <i>FABP2</i>	Zgodne z rolą FABP2 w metabolizmie lipidów oraz jego wzrostem w stresie enterocytarnym	Adaptacja do zmienionej podaży lipidów i/lub mikrouszkodzenie nabłonka; brak oznaczeń białka i markerów połączeń ścisłych nie pozwala rozstrzygnąć dominującego mechanizmu
↑ liczby komórek kubkowych	Zgodne z koncepcją aktywnej roli komórek okładzinowych w regulacji bariery	Odpowiedź kompensacyjna na presję luminalną i zapalną; wzmocnienie warstwy śluzu
↑ mRNA <i>IL10</i> (trend)	Zgodne z rolą IL-10 w kontroli zapalenia i utrzymaniu bariery	Komponent przeciwzapalny wspierający stabilność nabłonka
↓ grubości mięśniówki i podśluzówki przy braku zmian śluzówki	Częściowo zgodne z modelami niewydolności trzustkowej i wpływem stanu odżywienia	Możliwy efekt katabolizmu oraz zmniejszonego obciążenia mechanicznego; względne utrzymanie śluzówki może wynikać z mechanizmów adaptacyjnych
Skrócenie krypt z tendencją do ↑ VL/CD	Zmiany kosmki–krypta wrażliwe na środowisko hormonalne i zapalne	Potencjalne przesunięcie równowagi proliferacja–różnicowanie; brak markerów proliferacji wymaga ostrożności
↑ pola zwojów mięśniowych ENS przy stabilności zwoju podśluzówkowego	Zgodne z koncepcją selektywnej neuroplastyczności ENS w stanach zapalnych	Remodeling zwojów i/lub aktywacja gleju; odpowiedź na zmiany mechaniczne i immunologiczne
↑ mRNA <i>NPY</i>	Zgodne z rolą NPY w regulacji motoryki i osi neuro-odpornościowej	Możliwy komponent hamujący jako adaptacja do zaburzeń trawienia; marker remodelingu neurochemicznego

↓ mRNA <i>GIP</i> przy braku zmian liczby komórek GIP+	Zgodne z danymi, że ekspresja i sekrecja GIP zależą od bodźców luminalnych i mogą zmieniać się bez zmiany liczby komórek	Spadek ekspresji „na komórkę”; modulacja przez zmienione trawienie, pasaż i środowisko zapalne; brak danych funkcjonalnych ogranicza wnioskowanie metaboliczne
↑ mRNA <i>GCG</i> ↑ liczby komórek GLP-1 +	Zgodne z aktywacją L-komórek przez bodźce odżywcze, zapalne i sygnały mikrobiologiczne	Przebudowa osi proglukagonowej; możliwa równoległa aktywacja GLP-2 wspierająca barierę i odżywianie? śluzówki

9. WNIOSKI

1. Przewlekłe zapalenie trzustki indukowane ceruleiną u młodych świń prowadzi do selektywnej przebudowy jelita czczego, obejmującej przede wszystkim warstwy głębokie ściany jelita, ze ścięciem mięśniówki (zarówno warstwy okrężnej, jak i podłużnej) oraz podśluzówki, przy zachowaniu całkowitej grubości śluzówki.
2. W przebiegu PZT obserwuje się zmiany architektury osi kosmek-krypta, obejmujące skrócenie krypt, tendencję do wydłużenia kosmków oraz wzrost liczby komórek kubkowych.
3. Profil molekularny i immunohistochemiczny jelita czczego wskazuje na przebudowę osi enteroendokrynnej, obejmującą spadek ekspresji *GIP* oraz wzrost ekspresji *GCG* i liczby komórek GLP-1-dodatnich, przy braku zmian ekspresji *GIPR* i *GLP1R*.
4. W jelicie czczym świń z PZT stwierdzono wzrost ekspresji *NPY* i *FABP2* oraz trend wzrostu ekspresji *IL10*, a także zwiększenie pola powierzchni zwojów mięśniowych przy braku istotnych zmian w obrębie zwojów podśluzówkowych.

10. BIBLIOGRAFIA

- Abot, A., Cani, P. D., & Knauf, C. (2018). Impact of Intestinal Peptides on the Enteric Nervous System: Novel Approaches to Control Glucose Metabolism and Food Intake. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 328. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00328>
- Adler, G., Drewe, J., Steinmetz, A., Liyanage, K., & Beglinger, C. (1990). Pancreatic Secretory Responses to Long-Term Infusions of Secretin and Cerulein in Humans: *Pancreas*, 5(6), 685–692. <https://doi.org/10.1097/00006676-199011000-00008>
- Aghdassi, A. A., Mayerle, J., Christochowitz, S., Weiss, F. U., Sendler, M., & Lerch, M. M. (2011). Animal models for investigating chronic pancreatitis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 4(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-4-26>
- Ahlman, H., & Nilsson, O. (2001). The gut as the largest endocrine organ in the body. *Annals of Oncology*, 12, S63–S68. https://doi.org/10.1093/annonc/12.suppl_2.S63
- Ahrén, B. (1998). Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): A gut hormone of potential interest in the treatment of diabetes. *BioEssays*, 20(8), 642–651. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199808\)20:8%3C642::AID-BIES7%3E3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8%3C642::AID-BIES7%3E3.0.CO;2-K)
- Ammer-Herrmenau, C., Antweiler, K. L., Asendorf, T., Beyer, G., Buchholz, S. M., Cameron, S., Capurso, G., Damm, M., Dang, L., Frost, F., Gomes, A., Hamm, J., Henker, R., Hoffmeister, A., Meinhardt, C., Nawacki, L., Nunes, V., Panyko, A., Pardo, C., ... Neesse, A. (2024). Gut microbiota predicts severity and reveals novel metabolic signatures in acute pancreatitis. *Gut*, 73(3), 485–495. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2023-330987>
- Arciszewski, M. B., & Szymańczyk, S. (2021). Innervation of the gut. W *Atlas of the Pig Gut* (s. 53–67). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818958-0.00004-1>

- Ayuso, D., González, A., Hernández, F., Corral, J. M., & Izquierdo, M. (2013). Prediction of carcass composition, ham and foreleg weights, and lean meat yields of Iberian pigs using ultrasound measurements in live animals. *Journal of Animal Science*, *91*(4), 1884–1892. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5357>
- Banks, W. J. (1993). *Applied Veterinary Histology* (3. wyd.). CRC Press.
- Bansod, S., Aslam Saifi, M., Khurana, A., & Godugu, C. (2020). Nimbolide abrogates cerulein-induced chronic pancreatitis by modulating β -catenin/Smad in a sirtuin-dependent way. *Pharmacological Research*, *156*, 104756. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104756>
- Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: Critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(1), 19–33. <https://doi.org/10.1038/nrm3721>
- Baron, T. H., DiMaio, C. J., Wang, A. Y., & Morgan, K. A. (2020). American Gastroenterological Association Clinical Practice Update: Management of Pancreatic Necrosis. *Gastroenterology*, *158*(1), 67-75.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.07.064>
- Beaudet, A., Greenspun, D., Raelson, J., & Tannenbaum, G. S. (1995). Patterns of expression of SSTR1 and SSTR2 somatostatin receptor subtypes in the hypothalamus of the adult rat: Relationship to neuroendocrine function. *Neuroscience*, *65*(2), 551–561. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00486-O](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00486-O)
- Beglinger, C., Köhler, E., Stalder, G. A., Jansen, J., & Gyr, K. (2009). What Is the Maximal Effective Dose of Caerulein in Stimulating Pancreatic Secretion in Man? *Digestion*, 125–128. <https://doi.org/10.1159/000199357>
- Beumer, J., Artegiani, B., Post, Y., Reimann, F., Gribble, F., Nguyen, T. N., Zeng, H., Van Den Born, M., Van Es, J. H., & Clevers, H. (2018). Enteroendocrine cells switch hormone

- expression along the crypt-to-villus BMP signalling gradient. *Nature Cell Biology*, 20(8), 909–916. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0143-y>
- Beumer, J., & Clevers, H. (2016). Regulation and plasticity of intestinal stem cells during homeostasis and regeneration. *Development*, 143(20), 3639–3649. <https://doi.org/10.1242/dev.133132>
- Bieger, W., Peter, S., Völkl, A., & Kern, H. F. (1977). Amino acid transport in the rat exocrine pancreas: II. Inhibition by lanthanum and tetracaine. *Cell and Tissue Research*, 180(1), 45–62. <https://doi.org/10.1007/BF00227029>
- Birchenough, G. M. H., Johansson, M. E., Gustafsson, J. K., Bergström, J. H., & Hansson, G. C. (2015). New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunology*, 8(4), 712–719. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.32>
- Björnsson, E. S., Chey, W. D., Hooper, F., Woods, M. L., Owyang, C., & Hasler, W. L. (2002). Impaired gastrocolonic response and peristaltic reflex in slow-transit constipation: Role of 5-HT₃ pathways. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 283(2), G400–G407. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00082.2001>
- Boerma, D., Straatsburg, I. H., Offerhaus, G. J. A., Gouma, D. J., & Van Gulik, T. M. (2003). Experimental Model of Obstructive, Chronic Pancreatitis in Pigs. *Digestive Surgery*, 20(6), 520–526. <https://doi.org/10.1159/000073688>
- Braun, T., Volland, P., Kunz, L., Prinz, C., & Gratzl, M. (2007). Enterochromaffin Cells of the Human Gut: Sensors for Spices and Odorants. *Gastroenterology*, 132(5), 1890–1901. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.02.036>
- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M. A., & Severi, C. (2015). The gut-brain axis: Interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of Gastroenterology*, 28(2), 203–209.

- Carbone, S. E. (2022). Neurons, Macrophages, and Glia: The Role of Intercellular Communication in the Enteric Nervous System. W N. J. Spencer, M. Costa, & S. M. Brierley (Red.), *The Enteric Nervous System II* (T. 1383, s. 251–258). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-05843-1_24
- Castellheim, A., Brekke, O. -L., Espevik, T., Harboe, M., & Mollnes, T. E. (2009). Innate Immune Responses to Danger Signals in Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 69(6), 479–491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02255.x>
- Celiński, K., Dworzański, T., Słomka, M., & Mądro, A. (2011). Rys historyczny doświadczalnego ostrego zapalenia trzustki. *Postępy Nauk Medycznych*, 24(3), 242–248.
- Chan, Y. C., & Leung, P. S. (2007). Acute Pancreatitis: Animal Models and Recent Advances in Basic Research. *Pancreas*, 34(1), 1–14. <https://doi.org/10.1097/01.mpa.0000246658.38375.04>
- Chanpong, A., Borrelli, O., & Thapar, N. (2022). Recent advances in understanding the roles of the enteric nervous system. *Faculty Reviews*, 11. <https://doi.org/10.12703/r/11-7>
- Chelakkot, C., Ghim, J., & Ryu, S. H. (2018). Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(8), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0126-x>
- Chen, L., Yu, B., Luo, D., & Lin, M. (2018). Enteric motor dysfunctions in experimental chronic pancreatitis: Alterations of myenteric neurons regulating colonic motility in rats. *Neurogastroenterology & Motility*, 30(7), e13301. <https://doi.org/10.1111/nmo.13301>
- Chen, Q., Miller, L. J., & Dong, M. (2010). Role of N -linked glycosylation in biosynthesis, trafficking, and function of the human glucagon-like peptide 1 receptor. *American*

- Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 299(1), E62–E68.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00067.2010>
- Coleman, N. S., Marciani, L., Blackshaw, E., Wright, J., Parker, M., Yano, T., Yamazaki, S., Chan, P. Q., Wilde, K., Gowland, P. A., Perkins, A. C., & Spiller, R. C. (2003). Effect of a novel 5-HT₃ receptor agonist MKC-733 on upper gastrointestinal motility in humans. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 18(10), 1039–1048.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2003.01797.x>
- Costa, M., Brookes, S. J. H., & Hennig, G. W. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut*, 47(suppl 4), iv15–iv19.
https://doi.org/10.1136/gut.47.suppl_4.iv15
- Cui, J., Xiong, J., Zhang, Y., Peng, T., Huang, M., Lin, Y., Guo, Y., Wu, H., & Wang, C. (2017). Serum lactate dehydrogenase is predictive of persistent organ failure in acute pancreatitis. *Journal of Critical Care*, 41, 161–165.
<https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2017.05.001>
- Dąbrowski, A., Konturek, S. J., Konturek, J. W., & Gabryelewicz, A. (1999). Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis. *European Journal of Pharmacology*, 377(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00421-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00421-5)
- Demir, I. E., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2015). Neural plasticity in pancreatitis and pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(11), 649–659.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.166>
- Dominguez-Munoz, J. E., Drewes, A. M., Lindkvist, B., Ewald, N., Czakó, L., Rosendahl, J., Löhr, J. M., Löhr, M., Dominguez-Munoz, J. E., Besselink, M., Mayerle, J., Rosendahl, J., Lerch, M. M., Akisik, F., Kartalis, N., Manfredi, R., Iglesias-Garcia, J., Haas, S. L., Keller, J., ... Hegyi, P. (2018). Recommendations from the United European

- Gastroenterology evidence-based guidelines for the diagnosis and therapy of chronic pancreatitis. *Pancreatology*, 18(8), 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2018.09.016>
- Dowling, L. R., Strazzari, M. R., Keely, S., & Kaiko, G. E. (2022). Enteric nervous system and intestinal epithelial regulation of the gut-brain axis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 150(3), 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.07.015>
- Drucker, D. J., & Nauck, M. A. (2006). The incretin system: Glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet*, 368(9548), 1696–1705. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69705-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69705-5)
- Drucker, D. J., & Yusta, B. (2014). Physiology and Pharmacology of the Enteroendocrine Hormone Glucagon-Like Peptide-2. *Annual Review of Physiology*, 76(1), 561–583. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021113-170317>
- Dunlop, S. P., Coleman, N. S., Blackshaw, E., Perkins, A. C., Singh, G., Marsden, C. A., & Spiller, R. C. (2005). Abnormalities of 5-hydroxytryptamine metabolism in irritable bowel syndrome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 3(4), 349–357. [https://doi.org/10.1016/S1542-3565\(04\)00726-8](https://doi.org/10.1016/S1542-3565(04)00726-8)
- Dzięgiel, N., Szczurek, P., Jura, J., & Pieszka, M. (2018). The pig as an animal model in biomedical research: A review. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 72, 1032–1042. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.7815>
- Egerod, K. L., Engelstoft, M. S., Grunddal, K. V., Nøhr, M. K., Secher, A., Sakata, I., Pedersen, J., Windeløv, J. A., Füchtbauer, E.-M., Olsen, J., Sundler, F., Christensen, J. P., Wierup, N., Olsen, J. V., Holst, J. J., Zigman, J. M., Poulsen, S. S., & Schwartz, T. W. (2012). A Major Lineage of Enteroendocrine Cells Coexpress CCK, Secretin, GIP, GLP-1, PYY, and Neurotensin but Not Somatostatin. *Endocrinology*, 153(12), 5782–5795. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1595>

- El-Jamal, N., Erdual, E., Neunlist, M., Koriche, D., Dubuquoy, C., Maggiotto, F., Chevalier, J., Berrebi, D., Dubuquoy, L., Boulanger, E., Cortot, A., & Desreumaux, P. (2014). Glugacon-like peptide-2: Broad receptor expression, limited therapeutic effect on intestinal inflammation and novel role in liver regeneration. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 307(3), G274–G285. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00389.2012>
- Feng, L., He, Y., Zhai, Y., Yang, C., & Nie, K. (2026). Gastrointestinal motility disorders: From pathogenesis to therapeutic strategies. *Acta Materia Medica*, 5(1). <https://doi.org/10.15212/AMM-2025-0075>
- Ferrara, A., Zinner, M. J., & Jaffe, B. M. (1987). Intraluminal release of serotonin, substance P, and gastrin in the canine small intestine. *Digestive Diseases and Sciences*, 32(3), 289–294. <https://doi.org/10.1007/BF01297056>
- Foitzik, T., Hotz, H. G., Eibl, G., & Buhr, H. J. (2000). Experimental models of acute pancreatitis: Are they suitable for evaluating therapy? *International Journal of Colorectal Disease*, 15(3), 127–135. <https://doi.org/10.1007/s003840000216>
- Freitag, M., Standl, T. G., Kleinhans, H., Gottschalk, A., Mann, O., Rempf, C., Bachmann, K., Gocht, A., Petri, S., Izbicki, J. R., & Strate, T. (2006). Improvement of impaired microcirculation and tissue oxygenation by hemodilution with hydroxyethyl starch plus cell-free hemoglobin in acute porcine pancreatitis. *Pancreatology*, 6(3), 232–239. <https://doi.org/10.1159/000091962>
- Frieling, T. (2024). Building a Neurogastroenterology Unit: Why, Where, and How? *Visceral Medicine*, 1–4. <https://doi.org/10.1159/000540753>
- Fung, C., & Vanden Berghe, P. (2020). Functional circuits and signal processing in the enteric nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(22), 4505–4522. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03543-6>

- Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(5), 286–294. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>
- Furness, J. B., Callaghan, B. P., Rivera, L. R., & Cho, H.-J. (2014). The Enteric Nervous System and Gastrointestinal Innervation: Integrated Local and Central Control. W M. Lyte & J. F. Cryan (Red.), *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease* (T. 817, s. 39–71). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_3
- Furness, J. B., Rivera, L. R., Cho, H.-J., Bravo, D. M., & Callaghan, B. (2013). The gut as a sensory organ. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 10(12), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.180>
- Furness, J. B., Young, H. M., Pompolo, S., Bornstein, J. C., Kunze, W. A. A., & McConalogue, K. (1995). Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. *Gastroenterology*, 108(2), 554–563. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(95\)90086-1](https://doi.org/10.1016/0016-5085(95)90086-1)
- Galligan, J. J. (2017). 5-HT secretion by enterochromaffin cells is a very touching story. *The Journal of Physiology*, 595(1), 3–3. <https://doi.org/10.1113/JP273041>
- Geary, N. (2018). Cholecystokinin (CCK). W *Encyclopedia of Endocrine Diseases* (s. 529–533). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.95866-5>
- González-González, M., Díaz-Zepeda, C., Eyzaguirre-Velásquez, J., González-Arancibia, C., Bravo, J. A., & Julio-Pieper, M. (2019). Investigating Gut Permeability in Animal Models of Disease. *Frontiers in Physiology*, 9, 1962. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01962>
- Grasset, E., Puel, A., Charpentier, J., Collet, X., Christensen, J. E., Tercé, F., & Burcelin, R. (2017). A Specific Gut Microbiota Dysbiosis of Type 2 Diabetic Mice Induces GLP-1

- Resistance through an Enteric NO-Dependent and Gut-Brain Axis Mechanism. *Cell Metabolism*, 25(5), 1075–1090.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.013>
- Gribble, F. M., & Reimann, F. (2016). Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annual Review of Physiology*, 78(1), 277–299. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105439>
- Gribble, F. M., Reimann, F., & Roberts, G. P. (2018). Gastrointestinal Hormones ☆. W *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (s. 31–70). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809954-4.00002-5>
- Griffiths, T. L., Chater, N., Kemp, C., Perfors, A., & Tenenbaum, J. B. (2010). Probabilistic models of cognition: Exploring representations and inductive biases. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(8), 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.05.004>
- Grundeken, E., & El Aidy, S. (2025). Enteroendocrine cells: The gatekeepers of microbiome-gut-brain communication. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 11(1), 179. <https://doi.org/10.1038/s41522-025-00810-x>
- Grupp, K., Erbes, J., Poppe, A., Wodack, K., Gocht, A., Trepte, C., Havel, J., Mann, O., Izbicki, J. R., & Bachmann, K. (2019). Melatonin treatment of pigs with acute pancreatitis reduces inflammatory reaction of pancreatic tissue and enhances fitness score of pigs: Experimental research. *World Journal of Emergency Surgery*, 14(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13017-019-0237-2>
- Gustafsson, J. K., & Johansson, M. E. V. (2022). The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 19(12), 785–803. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00675-x>
- Gut, P., Czarnywojtek, A., Sawicka-Gutaj, N., Woliński, K., Janicka-Jedyńska, M., Bednarek-Rajewska, K., Furman, K., Fichna, M., & Ruchała, M. (2020). Evaluation of the expression of somatostatin receptors by immunohistochemistry in neuroendocrine

- tumors of the small intestine. *Polish Journal of Pathology*, 71(1), 30–37.
<https://doi.org/10.5114/pjp.2020.95413>
- Gutierrez-Aguilar, R., & Woods, S. C. (2011). Nutrition and L and K-enteroendocrine cells. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, 18(1), 35–41.
<https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32834190b5>
- Hankel, J., Mößeler, A., Hartung, C. B., Rath, S., Schulten, L., Visscher, C., Kamphues, J., & Vital, M. (2022). Responses of Ileal and Fecal Microbiota to Withdrawal of Pancreatic Enzyme Replacement Therapy in a Porcine Model of Exocrine Pancreatic Insufficiency. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11700.
<https://doi.org/10.3390/ijms231911700>
- Hayakawa, T., Kuwahara-Otani, S., Maeda, S., Tanaka, K., & Seki, M. (2013). Collateral projections of the dorsal motor nucleus of the vagus nerve to the stomach and the intestines in the rat. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 90(1), 7–15.
<https://doi.org/10.2535/ofaj.90.7>
- Hayashi, M., Haga, M., Yatsushiro, S., Yamamoto, A., & Moriyama, Y. (1999). Vesicular Monoamine Transporter 1 Is Responsible for Storage of 5-Hydroxytryptamine in Rat Pinealocytes. *Journal of Neurochemistry*, 73(6), 2538–2545.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0732538.x>
- Holbrook, J. D., Gill, C. H., Zebda, N., Spencer, J. P., Leyland, R., Rance, K. H., Trinh, H., Balmer, G., Kelly, F. M., Yusaf, S. P., Courtenay, N., Luck, J., Rhodes, A., Modha, S., Moore, S. E., Sanger, G. J., & Gunthorpe, M. J. (2009). Characterisation of 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} and 5-HT_{3E} receptor subunits: Evolution, distribution and function. *Journal of Neurochemistry*, 108(2), 384–396. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05775.x>

- Holst, J. J., Bolette Hartmann, C. F. D., & Pedersen, J. (2013). GLP 1/2, Enteroglucagon, Glicentin, and Oxyntomodulin. W *Handbook of Biologically Active Peptides* (s. 1241–1250). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00168-8>
- Hong, J., Fu, Y., Chen, X., Zhang, Y., Li, X., Li, T., Liu, Y., Fan, M., & Lin, R. (2024). Gut microbiome changes associated with chronic pancreatitis and pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Surgery*, 110(9), 5781–5794. <https://doi.org/10.1097/JS9.0000000000001724>
- Hooper, L. V. (2015). Epithelial Cell Contributions to Intestinal Immunity. W *Advances in Immunology* (T. 126, s. 129–172). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2014.11.003>
- Hoque, R., Malik, A. F., Gorelick, F., & Mehal, W. Z. (2012). Sterile Inflammatory Response in Acute Pancreatitis. *Pancreas*, 41(3), 353–357. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3182321500>
- Huang, Y.-M., Xu, B., Kuai, Z., He, Y.-T., Lu, Y., Shen, J.-P., Wu, K.-F., Wu, J.-Y., Ren, W.-Y., & Hu, Y. (2023). Glucagon-Like Peptide-2 Ameliorates Age-Associated Bone Loss and Gut Barrier Dysfunction in Senescence-Accelerated Mouse Prone 6 Mice. *Gerontology*, 69(4), 428–449. <https://doi.org/10.1159/000527502>
- Jalleh, R. J., Marathe, C. S., Rayner, C. K., Jones, K. L., Umapathysivam, M. M., Wu, T., Quast, D. R., Plummer, M. P., Nauck, M. A., & Horowitz, M. (2024). Physiology and Pharmacology of Effects of GLP-1-based Therapies on Gastric, Biliary and Intestinal Motility. *Endocrinology*, 166(1), bqae155. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqae155>
- Jamka, J. R., & Gulbransen, B. D. (2025). Mechanisms of enteric neuropathy in diverse contexts of gastrointestinal dysfunction. *Neurogastroenterology & Motility*, 37(8), e14870. <https://doi.org/10.1111/nmo.14870>

- Jankowski, W. M., Fichna, J., & Tarasiuk-Zawadzka, A. (2025). A systematic review of the relationship between gut microbiota and prevalence of pancreatic diseases. *Microbial Pathogenesis*, 199, 107214. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107214>
- Johansson, M. E. V., & Hansson, G. C. (2016). Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. *Nature Reviews Immunology*, 16(10), 639–649. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.88>
- Kahle, M., Lippert, J., Willemer, S., Pabst, W., & Martin, P. (1991). Effects of positive end-expiratory pressure (PEEP) ventilation on the exocrine pancreas in minipigs. *Research in Experimental Medicine*, 191(1), 309–325. <https://doi.org/10.1007/BF02576687>
- Kaleczyc, J., Pidsudko, M., Franke-Radowiecka, A., Cecio, A., & Timmermans, J. P. (2004). The Distribution and Chemical Coding of Neurons in the Celiac-Superior Mesenteric Ganglion Complex Supplying the Normal and Inflamed Ileum in the Pig. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 7, 199–101.
- Ke, L., Tong, Z., Ni, H., Ding, W., Sun, J., Li, W., Li, N., & Li, J. (2012). The Effect of Intra-Abdominal Hypertension Incorporating Severe Acute Pancreatitis in a Porcine Model. *PLoS ONE*, 7(3), e33125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033125>
- Kellum, J. M., Albuquerque, F. C., Stoner, M. C., & Harris, R. P. (1999). Stroking human jejunal mucosa induces 5-HT release and Cl⁻ secretion via afferent neurons and 5-HT₄ receptors. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 277(3), G515–G520. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.277.3.G515>
- Kidd, M., Modlin, I. M., Gustafsson, B. I., Drozdov, I., Hauso, O., & Pfragner, R. (2008). Luminal regulation of normal and neoplastic human EC cell serotonin release is mediated by bile salts, amines, tastants, and olfactants. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(2), G260–G272. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00056.2008>

- Kim, H. (2008). Cerulein Pancreatitis: Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *Gut and Liver*, 2(2), 74–80. <https://doi.org/10.5009/gnl.2008.2.2.74>
- Kinnala, P. J., Kuttala, K. T., Grönroos, J. M., Havia, T. V., Nevalainen, T. J., & Niinikoski, J. (1999). Central haemodynamics in experimental acute pancreatitis. *The European Journal of Surgery = Acta Chirurgica*, 165(6), 598–603. <https://doi.org/10.1080/110241599750006532>
- Kiriyama, S., Gabata, T., Takada, T., Hirata, K., Yoshida, M., Mayumi, T., Hirota, M., Kadoya, M., Yamanouchi, E., Hattori, T., Takeda, K., Kimura, Y., Amano, H., Wada, K., Sekimoto, M., Arata, S., Yokoe, M., & Hirota, M. (2010). New diagnostic criteria of acute pancreatitis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 17(1), 24–36. <https://doi.org/10.1007/s00534-009-0214-3>
- Klauss, S., Schorn, S., Teller, S., Steenfadt, H., Friess, H., Ceyhan, G. O., & Demir, I. E. (2018). Genetically induced vs. classical animal models of chronic pancreatitis: A critical comparison. *The FASEB Journal*, 32(11), 5778–5792. <https://doi.org/10.1096/fj.201800241RR>
- Knauf, C., Abot, A., Wemelle, E., & Cani, P. D. (2020). Targeting the Enteric Nervous System to Treat Metabolic Disorders? “Enterosynes” as Therapeutic Gut Factors. *Neuroendocrinology*, 110(1–2), 139–146. <https://doi.org/10.1159/000500602>
- Knop, F. K., Vilsbøll, T., Larsen, S., Højberg, P. V., Vølund, A., Madsbad, S., Holst, J. J., & Krarup, T. (2007). Increased postprandial responses of GLP-1 and GIP in patients with chronic pancreatitis and steatorrhea following pancreatic enzyme substitution. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 292(1), E324–E330. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00059.2006>
- Kobryń, H., & Kobryńczuk, F. (2012). *Anatomia zwierząt* (T. 3). Wydawnictwo Naukowe PWN.

- König, H. E., & Liebich, H.-G. (2020). *Veterinary Anatomy of Domestic Animals: Textbook and Colour Atlas* (7. wyd.). Georg Thieme.
- Konturek, J. W., Stoll, R., Konturek, S. J., & Domschke, W. (1993). Cholecystokinin in the control of gastric acid secretion in man. *Gut*, 34(3), 321–328. <https://doi.org/10.1136/gut.34.3.321>
- Krejs, G. J. (1986). Physiological Role of Somatostatin in the Digestive Tract: Gastric Acid Secretion, Intestinal Absorption, and Motility. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 21(sup119), 47–53. <https://doi.org/10.3109/00365528609087431>
- Kuan, L. L., Dennison, A. R., & Garcea, G. (2021). Prevalence and Impact of Sarcopenia in Chronic Pancreatitis: A Review of the Literature. *World Journal of Surgery*, 45(2), 590–597. <https://doi.org/10.1007/s00268-020-05828-0>
- Lampel, M., & Kern, H. F. (1977). Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histology*, 373(2), 97–117. <https://doi.org/10.1007/BF00432156>
- Larsen, I. M., Holten-Rossing, S., Mark, E. B., Poulsen, J. L., Krogh, K., Scott, S. M., Olesen, S. S., & Drewes, A. M. (2022). Regional gastrointestinal transit times in patients with chronic pancreatitis. *Medicine*, 101(41), e31141. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000031141>
- Latorre, R., Sternini, C., De Giorgio, R., & Greenwood-Van Meerveld, B. (2016). Enteroendocrine cells: A review of their role in brain–gut communication. *Neurogastroenterology & Motility*, 28(5), 620–630. <https://doi.org/10.1111/nmo.12754>
- Lebrun, L. J., Lenaerts, K., Kiers, D., Pais De Barros, J.-P., Le Guern, N., Plesnik, J., Thomas, C., Bourgeois, T., Dejong, C. H. C., Kox, M., Hundscheid, I. H. R., Khan, N. A., Mandard, S., Deckert, V., Pickkers, P., Drucker, D. J., Lagrost, L., & Grober, J. (2017). Enteroendocrine L Cells Sense LPS after Gut Barrier Injury to Enhance GLP-1

- Secretion. *Cell Reports*, 21(5), 1160–1168.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.008>
- Lehmann, A., & Hornby, P. J. (2016). Intestinal SGLT1 in metabolic health and disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 310(11), G887–G898. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00068.2016>
- Li, W., Yu, G., Liu, Y., & Sha, L. (2019). Intrapancreatic Ganglia and Neural Regulation of Pancreatic Endocrine Secretion. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 21. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00021>
- Liddle, R. A. (2019). Neuropods. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 7(4), 739–747. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.01.006>
- Lindkvist, B. (2013). Diagnosis and treatment of pancreatic exocrine insufficiency. *World Journal of Gastroenterology*, 19(42), 7258. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i42.7258>
- Liu, L., Zhang, T., Sui, Y., Li, G., Liu, L., Lu, T., Tan, H., Sun, B., Li, X., & Li, L. (2023). Gut microbiota affects pancreatic fibrotic progression through immune modulation in chronic pancreatitis. *Microbial Pathogenesis*, 177, 106035. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106035>
- Löhr, J. M., Dominguez-Munoz, E., Rosendahl, J., Besselink, M., Mayerle, J., Lerch, M. M., Haas, S., Akisik, F., Kartalis, N., Iglesias-Garcia, J., Keller, J., Boermeester, M., Werner, J., Dumonceau, J., Fockens, P., Drewes, A., Ceyhan, G., Lindkvist, B., Drenth, J., ... HaPanEU/UEG Working Group. (2017). United European Gastroenterology evidence-based guidelines for the diagnosis and therapy of chronic pancreatitis (HaPanEU). *United European Gastroenterology Journal*, 5(2), 153–199. <https://doi.org/10.1177/2050640616684695>

- Lomax, A. E., Fernández, E., & Sharkey, K. A. (2005). Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterology & Motility*, 17(1), 4–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2004.00607.x>
- Low, M. J. (2004). The somatostatin neuroendocrine system: Physiology and clinical relevance in gastrointestinal and pancreatic disorders. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 18(4), 607–622. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2004.08.005>
- Luo, M., Jin, T., Fang, Y., Chen, F., Zhu, L., Bai, J., & Ding, J. (2025). Signaling Pathways Involved in Acute Pancreatitis. *Journal of Inflammation Research, Volume 18*, 2287–2303. <https://doi.org/10.2147/JIR.S485804>
- Luu, A. M., Brock, A., Ritz, S., Junghänel, S., Aldag, I., Edskes, S., Hartmann, M., Hessler, M., Praktijnjo, M., Arnemann, P., Ertmer, C., Uhl, W., Schnekenburger, J., & Herzog, T. (2020). Long term follow-up of a simplified and less burdened pancreatic duct ligation model of exocrine pancreatic insufficiency in Goettingen Minipigs. *BMC Gastroenterology*, 20(1), 403. <https://doi.org/10.1186/s12876-020-01541-3>
- Martínez-Noguera, A., & D’Onofrio, M. (2007). Ultrasonography of the pancreas. 1. Conventional imaging. *Abdominal Imaging*, 32(2), 136–149. <https://doi.org/10.1007/s00261-006-9079-y>
- Mawe, G. M., Sanders, K. M., & Camilleri, M. (2023). Overview of the Enteric Nervous System. *Seminars in Neurology*, 43(04), 495–505. <https://doi.org/10.1055/s-0043-1771466>
- McConalogue, K., & Furness, J. B. (1994). 3 Gastrointestinal neurotransmitters. *Baillière’s Clinical Endocrinology and Metabolism*, 8(1), 51–76. [https://doi.org/10.1016/S0950-351X\(05\)80226-5](https://doi.org/10.1016/S0950-351X(05)80226-5)

- Meriläinen, S., Mäkelä, J., Anttila, V., Koivukangas, V., Kaakinen, H., Niemelä, E., Ohtonen, P., Risteli, J., Karttunen, T., Soini, Y., & Juvonen, T. (2008). Acute edematous and necrotic pancreatitis in a porcine model. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 43(10), 1259–1268. <https://doi.org/10.1080/00365520802158580>
- Miller, M. A., & Zachary, J. F. (2017). Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. W *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (s. 2-43.e19). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00001-1>
- Modlin, I. M., Kidd, M., Pfragner, R., Eick, G. N., & Champaneria, M. C. (2006). The Functional Characterization of Normal and Neoplastic Human Enterochromaffin Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(6), 2340–2348. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0110>
- Moran, G. W., O'Neill, C., & McLaughlin, J. T. (2012). GLP-2 enhances barrier formation and attenuates TNF α -induced changes in a Caco-2 cell model of the intestinal barrier. *Regulatory Peptides*, 178(1–3), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2012.07.002>
- Mukherjee, P., Roy, S., Ghosh, D., & Nandi, S. K. (2022). Role of animal models in biomedical research: A review. *Laboratory Animal Research*, 38(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s42826-022-00128-1>
- Müller, T. D., Adriaenssens, A., Ahrén, B., Blüher, M., Birkenfeld, A. L., Campbell, J. E., Coghlan, M. P., D'Alessio, D., Deacon, C. F., DelPrato, S., Douros, J. D., Drucker, D. J., Figueredo Burgos, N. S., Flatt, P. R., Finan, B., Gimeno, R. E., Gribble, F. M., Hayes, M. R., Hölscher, C., ... Tschöp, M. H. (2025). Glucose-dependent insulinitropic polypeptide (GIP). *Molecular Metabolism*, 95, 102118. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2025.102118>

- Newcom, D. W., Baas, T. J., & Lampe, J. F. (2002). Prediction of intramuscular fat percentage in live swine using real-time ultrasound1. *Journal of Animal Science*, 80(12), 3046–3052. <https://doi.org/10.2527/2002.80123046x>
- Nezami, B. G., & Srinivasan, S. (2010). Enteric Nervous System in the Small Intestine: Pathophysiology and Clinical Implications. *Current Gastroenterology Reports*, 12(5), 358–365. <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0129-9>
- Olesen, S. S., Frøkjær, J. B., Lelic, D., Valeriani, M., & Drewes, A. M. (2011). Pain-Associated Adaptive Cortical Reorganisation in Chronic Pancreatitis. *Pancreatology*, 10(6), 742–751. <https://doi.org/10.1159/000321644>
- Papoutsopoulou, S., Pollock, L., Walker, C., Tench, W., Samad, S. S., Bergey, F., Lenzi, L., Sheibani-Tezerji, R., Rosenstiel, P., Alam, M. T., Martins Dos Santos, V. A. P., Müller, W., & Campbell, B. J. (2021). Impact of Interleukin 10 Deficiency on Intestinal Epithelium Responses to Inflammatory Signals. *Frontiers in Immunology*, 12, 690817. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.690817>
- Park, M. K. (2016). Glucagon-Like Peptide-1. W *Handbook of Hormones* (s. 135-e17C-5). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00140-9>
- Penman, E., Wass, J. A. H., Butler, M. G., Penny, E. S., Price, J., Wu, P., & Rees, L. H. (1983). Distribution and characterisation of immunoreactive somatostatin in human gastrointestinal tract. *Regulatory Peptides*, 7(1), 53–65. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(83\)90281-1](https://doi.org/10.1016/0167-0115(83)90281-1)
- Perakakis, N., & Mantzoros, C. S. (2020). The Role of Glicentin and Oxyntomodulin in Human Metabolism: New Evidence and New Directions. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 105(8), e3003–e3005. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa329>

- Pezzilli, R., Melzi D'Eril, G. V., Morselli-Labate, A. M., Merlini, G., Barakat, B., & Bosoni, T. (2000). Serum Amyloid A, Procalcitonin, and C-Reactive Protein in Early Assessment of Severity of Acute Pancreatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 45(6), 1072–1078. <https://doi.org/10.1023/A:1005525329939>
- Pidsudko, Z., Wasowicz, K., Sienkiewicz, W., Kaleczyc, J., Czaja, K., & Łakomy, M. (2003). The influence of inflammation on the expression of neuropeptides in the ileum-projecting primary sensory neurones in the pig: 235-237. *Folia Morphologica*, 62(3).
- Portela-Gomes, G. M., Stridsberg, M., Johansson, H., & Grimelius, L. (1997). Complex Co-localization of Chromogranins and Neurohormones in the Human Gastrointestinal Tract. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45(6), 815–822. <https://doi.org/10.1177/002215549704500606>
- Prykhodko, O., Fedkiv, O., Weström, B. R., & Pierzynowski, S. G. (2014). Effects on gut properties in exocrine pancreatic insufficient (EPI) pigs, being growth retarded due to pancreatic duct ligation at 7 weeks but not at 16 weeks of age. *Advances in Medical Sciences*, 59(1), 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2013.08.004>
- Rand, M. S. (2008). Selection of Biomedical Animal Models. W P. M. Conn (Red.), *Sourcebook of Models for Biomedical Research* (s. 9–15). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-285-4_2
- Rasoamanana, R., Darcel, N., Fromentin, G., & Tomé, D. (2012). Nutrient sensing and signalling by the gut. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(4), 446–455. <https://doi.org/10.1017/S0029665112000110>
- Rastelli, M., Cani, P. D., & Knauf, C. (2019). The Gut Microbiome Influences Host Endocrine Functions. *Endocrine Reviews*, 40(5), 1271–1284. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00280>

- Reece, W. O., & Rowe, E. W. (2017). *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. John Wiley and Sons.
- Reichlin, S. (1987). Secretion of somatostatin and its physiologic function. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 109(3), 320–326.
- Ren, W., Wu, J., Li, L., Lu, Y., Shao, Y., Qi, Y., Xu, B., He, Y., & Hu, Y. (2018). Glucagon-Like Peptide-2 Improve Intestinal Mucosal Barrier Function in Aged Rats. *The Journal of Nutrition, Health and Aging*, 22(6), 731–738. <https://doi.org/10.1007/s12603-018-1022-8>
- Ribet, A., Tournut, R., Duffaut, M., & Vaysse, N. (1976). Use of caerulein with submaximal doses of secretin as a test of pancreatic function in man. *Gut*, 17(6), 431–434. <https://doi.org/10.1136/gut.17.6.431>
- Robberecht, P., Cremer, M., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M. C., Cotton, P., De Neef, P., & Christophe, J. (1975). Pancreatic secretion of total protein and of three hydrolases collected in healthy subjects via duodenoscopic cannulation. Effects of secretin, pancreozymin, and caerulein. *Gastroenterology*, 69(2), 374–379.
- Saluja, A. K., & Dudeja, V. (2013). Relevance of Animal Models of Pancreatic Cancer and Pancreatitis to Human Disease. *Gastroenterology*, 144(6), 1194–1198. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.070>
- Sarner, M., & Cotton, P. B. (1984). Classification of pancreatitis. *Gut*, 25(7), 756–759. <https://doi.org/10.1136/gut.25.7.756>
- Schepis, T., De Lucia, S. S., Nista, E. C., Manilla, V., Pignataro, G., Ojetto, V., Piccioni, A., Gasbarrini, A., Franceschi, F., & Candelli, M. (2021). Microbiota in Pancreatic Diseases: A Review of the Literature. *Journal of Clinical Medicine*, 10(24), 5920. <https://doi.org/10.3390/jcm10245920>

- Schneider, A., & Whitcomb, D. C. (2002). Hereditary pancreatitis: A model for inflammatory diseases of the pancreas. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 16(3), 347–363. <https://doi.org/10.1053/bega.2002.0311>
- Schrauwen, E., & Houvenaghel, A. (1979). Influence of Caerulein on Mesenteric Hemodynamics in the Pig. *Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe A*, 26(7), 587–589. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1979.tb01636.x>
- Schubert, D. C., Mößeler, A., Ahlfänger, B., Langeheine, M., Brehm, R., Visscher, C., Abd El-Wahab, A., & Kamphues, J. (2022). Influences of exocrine pancreatic insufficiency on nutrient digestibility, growth parameters as well as anatomical and histological morphology of the intestine in a juvenile pig model. *Frontiers in Medicine*, 9, 973589. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.973589>
- Señaris, R. M., Schindler, M., Humphrey, P. P. A., & Emson, P. C. (1995). Expression of somatostatin receptor 3 mRNA in the motoneurons of the rat spinal cord, and the sensory neurones of the spinal ganglia. *Molecular Brain Research*, 29(1), 185–190. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(94\)00275-J](https://doi.org/10.1016/0169-328X(94)00275-J)
- Seretis, E. C., Agnantis, N. J., Golematis, V. C., & Voloudakis-Balatzis, I. E. (2004). Electron immunocytochemical demonstration of serotonin, vasoactive intestinal polypeptide, bombesin, somatostatin and glucagon in mirror biopsies from primary colorectal adenocarcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 23(3), 477–484.
- Sharkey, K. A. (2015). Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. *Journal of Clinical Investigation*, 125(3), 918–925. <https://doi.org/10.1172/JCI76303>
- Sharkey, K. A., & Kroese, A. B. A. (2001). Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: Neuronal activation induced by inflammatory mediators. *The*

- Anatomical Record*, 262(1), 79–90. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20010101\)262:1%3C79::AID-AR1013%3E3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20010101)262:1%3C79::AID-AR1013%3E3.0.CO;2-K)
- Sharkey, K. A., & Mawe, G. M. (2023). The enteric nervous system. *Physiological Reviews*, 103(2), 1487–1564. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2022>
- Shulkes, A. (2004). Neurotensin. W *Encyclopedia of Endocrine Diseases* (s. 346–349). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-475570-4/00917-3>
- Sjölund, K., Sandén, G., Håkanson, R., & Sundler, F. (1983). Endocrine Cells in Human Intestine: An Immunocytochemical Study. *Gastroenterology*, 85(5), 1120–1130. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(83\)80080-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(83)80080-8)
- Smits, M. M., Tonneijck, L., Muskiet, M. H. A., Kramer, M. H. H., Cahen, D. L., & Van Raalte, D. H. (2016). Gastrointestinal actions of glucagon-like peptide-1-based therapies: Glycaemic control beyond the pancreas. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 18(3), 224–235. <https://doi.org/10.1111/dom.12593>
- Spiller, R. (2008). Serotonin and GI clinical disorders. *Neuropharmacology*, 55(6), 1072–1080. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.016>
- Stanisz, A. M., Befus, D., & Bienenstock, J. (1986). Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer’s patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. *Journal of Immunology*, 136(1), 152–156.
- Sternini, C., Anselmi, L., & Rozengurt, E. (2008). Enteroendocrine cells: A site of ‘taste’ in gastrointestinal chemosensing. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, 15(1), 73–78. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3282f43a73>
- Su, S.-B., Motoo, Y., Xie, M.-J., Mouri, H., Asayama, K., & Sawabu, N. (2002). Superoxide Dismutase Is Induced During Rat Pancreatic Acinar Cell Injury: *Pancreas*, 24(2), 146–152. <https://doi.org/10.1097/00006676-200203000-00005>

- Sunardi, M., & Cirillo, C. (2023). Mini-review: “Enteric glia functions in nervous tissue repair: Therapeutic target or tool?”. *Neuroscience Letters*, 812, 137360. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137360>
- Suvarna, K. S., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2019). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-00143-5>
- Szabó, C., Kachungwa Lugata, J., & Ortega, A. D. S. V. (2023). Gut Health and Influencing Factors in Pigs. *Animals*, 13(8), 1350. <https://doi.org/10.3390/ani13081350>
- Theodoropoulou, M., & Stalla, G. K. (2013). Somatostatin receptors: From signaling to clinical practice. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 34(3), 228–252. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.07.005>
- Timmermans, J. P., Scheuermann, D. W., Stach, W., Adriaensen, D., & De Groodt-Lasseel, M. H. (1992). Functional morphology of the enteric nervous system with special reference to large mammals. *European Journal of Morphology*, 30(2), 113–122.
- Tiribelli, C., & Ostrow, J. D. (1996). New Concepts in Bilirubin and Jaundice: Report of the Third International Bilirubin Workshop, April 6–8, 1995, Trieste, Italy. *Hepatology*, 24(5), 1296–1311. <https://doi.org/10.1002/hep.510240551>
- Tomaszewska, E., Świątkiewicz, M., Muszyński, S., Donaldson, J., Ropka-Molik, K., Arciszewski, M. B., Murawski, M., Schwarz, T., Dobrowolski, P., Szymańczyk, S., Dresler, S., & Bonior, J. (2023). Repetitive Cerulein-Induced Chronic Pancreatitis in Growing Pigs—A Pilot Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 7715. <https://doi.org/10.3390/ijms24097715>
- Truty, M. J., & Smoot, R. L. (2008). Animal Models in Pancreatic Surgery: A Plea for Pork. *Pancreatology*, 8(6), 546–550. <https://doi.org/10.1159/000160214>

- Vaquero, E., Molero, X., Puig-Diví, V., & Malagelada, J.-R. (1998). Contrasting effects of circulating nitric oxide and nitrergic transmission on exocrine pancreatic secretion in rats. *Gut*, 43(5), 684–691. <https://doi.org/10.1136/gut.43.5.684>
- Vasina, V., Barbara, G., Talamonti, L., Stanghellini, V., Corinaldesi, R., Tonini, M., De Ponti, F., & De Giorgio, R. (2006). Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Autonomic Neuroscience*, 126–127, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.02.025>
- Vella, A. (2016). Gastrointestinal Hormones and Gut Endocrine Tumors. W *Williams Textbook of Endocrinology* (s. 1701–1722). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-29738-7.00038-1>
- Verspohl, E. J. (2009). Novel therapeutics for type 2 diabetes: Incretin hormone mimetics (glucagon-like peptide-1 receptor agonists) and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*, 124(1), 113–138. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.06.002>
- Vollmar, B., Waldner, H., Schmand, J., Conzen, P. F., Goetz, A. E., Habazettl, H., Schweiberer, L., & Brendel, W. (1991). Oleic acid induced pancreatitis in pigs. *Journal of Surgical Research*, 50(2), 196–204. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(91\)90247-J](https://doi.org/10.1016/0022-4804(91)90247-J)
- Völzke, H., Baumeister, S. E., Alte, D., Hoffmann, W., Schwahn, C., Simon, P., John, U., & Lerch, M. M. (2005). Independent Risk Factors for Gallstone Formation in a Region with High Cholelithiasis Prevalence. *Digestion*, 71(2), 97–105. <https://doi.org/10.1159/000084525>
- Wallrapp, A., & Chiu, I. M. (2024). Neuroimmune Interactions in the Intestine. *Annual Review of Immunology*, 42(1), 489–519. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101921-042929>

- Wang, H. (2005). Amelioration of hemodynamics and oxygen metabolism by continuous venovenous hemofiltration in experimental porcine pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 11(1), 127. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i1.127>
- Wang, X., Yin, L., Geng, C., Zhang, J., Li, J., Huang, P., Li, Y., Wang, Q., & Yang, H. (2025). Impact of different feed intake levels on intestinal morphology and epithelial cell differentiation in piglets. *Journal of Animal Science*, 103, skae262. <https://doi.org/10.1093/jas/skae262>
- Warner, B. W. (2016). The Pathogenesis of Resection-Associated Intestinal Adaptation. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2(4), 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.05.001>
- Wei, P., Keller, C., & Li, L. (2020). Neuropeptides in gut-brain axis and their influence on host immunity and stress. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 843–851. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.02.018>
- Willemer, S., Elsässer, H.-P., & Adler, G. (2008). Hormone-Induced Pancreatitis. *European Surgical Research*, 24(1), 29–39. <https://doi.org/10.1159/000129237>
- Williams, J. A., Krawitz, B., & Hou, Y. (2014). Caerulein. W *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. <https://doi.org/10.3998/panc.2014.15>
- Witt, H., Apte, M. V., Keim, V., & Wilson, J. S. (2007). Chronic Pancreatitis: Challenges and Advances in Pathogenesis, Genetics, Diagnosis, and Therapy. *Gastroenterology*, 132(4), 1557–1573. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.001>
- Wolfe, M. M., Boylan, M. O., & Chin, W. W. (2025). Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide in Incretin Physiology: Role in Health and Disease. *Endocrine Reviews*, 46(4), 479–500. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaf006>

- Wood, J. D., & Kirchgessner, A. (2004). Slow excitatory metabotropic signal transmission in the enteric nervous system. *Neurogastroenterology & Motility*, *16*(s1), 71–80. <https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00479.x>
- Wu, C., Li, M., & Chen, W. (2021). Characteristics of Gut Microbiota in Cerulein-Induced Chronic Pancreatitis. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, *Volume 14*, 285–294. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S291822>
- Wynne, K., Field, B. C., & Bloom, S. R. (2010). The mechanism of action for oxyntomodulin in the regulation of obesity. *Current Opinion in Investigational Drugs*, *11*(10), 1151–1157.
- Yang, X., Yao, L., Fu, X., Mukherjee, R., Xia, Q., Jakubowska, M. A., Ferdek, P. E., & Huang, W. (2020). Experimental Acute Pancreatitis Models: History, Current Status, and Role in Translational Research. *Frontiers in Physiology*, *11*, 614591. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.614591>
- Yin, X., Xu, J., Zhang, Q., Yang, L., & Duan, Y. (2020). Quantification analysis of lactate dehydrogenase and C-reactive protein in evaluation of the severity and prognosis of the acute pancreatitis. *Cellular and Molecular Biology*, *66*(1), 122–125.
- Yu, D., Zhu, W., & Hang, S. (2019). Effects of low-protein diet on the intestinal morphology, digestive enzyme activity, blood urea nitrogen, and gut microbiota and metabolites in weaned pigs. *Archives of Animal Nutrition*, *73*(4), 287–305. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2019.1614849>
- Zhang, C., Li, G., Lu, T., Liu, L., Sui, Y., Bai, R., Li, L., & Sun, B. (2023). The Interaction of Microbiome and Pancreas in Acute Pancreatitis. *Biomolecules*, *14*(1), 59. <https://doi.org/10.3390/biom14010059>

Zimmerman, P., Huseynova, K., & Pillai, L. (2019). Anatomy and Physiology of the Mesenteric Circulation. W *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set* (s. 1014–1026). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40232-3.00086-8>

11. SPIS RYCIN

RYCINA 1. SCHEMAT WYKONYWANIA POMIARÓW HISTOMORFOMETRYCZNYCH GRUBOŚCI BŁONY ŚLUZOWEJ, PODŚLUZOWEJ I MIĘŚNIOWEJ ORAZ DŁUGOŚCI I SZEROKOŚCI KOSMKÓW JELITOWYCH.....	35
RYCINA 2. SCHEMAT WYKONYWANIA POMIARÓW HISTOMORFOMETRYCZNYCH GŁĘBOKOŚCI I SZEROKOŚCI I LICZBY KRYPT JELITOWYCH ORAZ LICZBY ENTEROCYTÓW I KOMÓREK KUBKOWYCH.....	36
RYCINA 3. REAKCJA IMMUNOHISTOCHEMICZNA IHC Z WYKORZYSTANIEM PRZECIWCIAŁA ANTY-HuC/D W CELU OCENY ZWOJÓW NERWOWYCH MIĘŚNIOWYCH I PODŚLUZÓWKOWYCH.....	37
RYCINA 4. SCHEMAT WYKONYWANIA POMIARÓW HISTOMORFOMETRYCZNYCH W OBRĘBIE ZWOJÓW W CELU OKREŚLENIA LICZBY NEURONÓW ORAZ POŁA POWIERZCHNI.	37
RYCINA 5. PRZYKŁADOWE POZYTYWNE REAKCJE GIP ORAZ GLP W KOSMKACH I KRYPTACH.	38
RYCINA 6. ZMIANY MAS CIAŁA ZDROWYCH PROSIĄT KONTROLNYCH (KONTROLA) I PROSIĄT Z GRUPY DOŚWIADCZALNEJ (PZT), U KTÓREJ POPRZECZ PODAWANIE CERULEINY WYWOŁANO PZT..	40
RYCINA 7. WZGLĘDNY POZIOM EKSPRESJI MRNA GENÓW <i>GIP</i> I <i>GIPR</i> W JELICIE CZCZYM ŚWIŃ Z GRUPY KONTROLNEJ I PZT.....	41
RYCINA 8. WZGLĘDNY POZIOM EKSPRESJI MRNA GENÓW <i>GCG</i> I <i>GLPIR</i> I W JELICIE CZCZYM ŚWIŃ Z GRUPY KONTROLNEJ I PZT..	41
RYCINA 9. WZGLĘDNY POZIOM EKSPRESJI MRNA GENÓW <i>NPY</i> , <i>FABP2</i> I <i>IL10</i> W JELICIE CZCZYM ŚWIŃ Z GRUPY KONTROLNEJ I PZT..	42
RYCINA 10. IMMUNOHISTOCHEMICZNA LOKALIZACJA KOMÓREK GIP-DODATNICH (STRZAŁKI) W KOSMKACH I KRYPTACH JELITOWYCH JELITA CZCZEGO ŚWIŃ Z GRUPY KONTROLNEJ I PZT ORAZ WYNIKI ILOŚCIOWEJ ANALIZY LICZBY KOMÓREK IMMUNOREAKTYWNYCH WZGLĘDEM GIP.	43
RYCINA 11. IMMUNOHISTOCHEMICZNA LOKALIZACJA KOMÓREK GLP-1-DODATNICH (STRZAŁKI) W KOSMKACH I KRYPTACH JELITOWYCH JELITA CZCZEGO ŚWIŃ Z GRUPY KONTROLNEJ I PZT ORAZ WYNIKI ILOŚCIOWEJ ANALIZY LICZBY KOMÓREK IMMUNOREAKTYWNYCH WZGLĘDEM GLP-1.....	44

RYCINA 12. REPREZENTATYWNE MIKROFOTOGRAFIE ŚCIANY JELITA CZCZEGO ŚWIŃ Z GRUPY KONTROLNEJ I PZT BARWIONE METODĄ TRÓJCHROMOWĄ ORAZ WYNIKI ANALIZY HISTOMORFOMETRYCZNEJ GRUBOŚCI POSZCZEGÓLNYCH WARSTW ŚCIANY JELITA...	46
RYCINA 13. REPREZENTATYWNE MIKROFOTOGRAFIE PRZEKROJU JELITA CZCZEGO ŚWIŃ Z GRUPY KONTROLNEJ I PZT BARWIONE METODĄ TRÓJCHROMOWĄ ORAZ WYNIKI ANALIZY HISTOMORFOMETRYCZNEJ KOSMKÓW I KRYPT JELITOWYCH.....	47
RYCINA 14. REPREZENTATYWNE MIKROFOTOGRAFIE KOSMKÓW JELITOWYCH ŚWIŃ Z GRUPY KONTROLNEJ I PZT BARWIONYCH METODĄ TRÓJCHROMOWĄ, PRZEDSTAWIAJĄCE ENTEROCYTY ORAZ KOMÓRKI KUBKOWE , A TAKŻE WYNIKI ILOŚCIOWEJ ANALIZY LICZBY ENTEROCYTÓW, LICZBY KOMÓREK KUBKOWYCH ORAZ STOSUNKU LICZBY ENTEROCYTÓW DO LICZBY KOMÓREK KUBKOWYCH..	48
RYCINA 15. REPREZENTATYWNE MIKROFOTOGRAFIE ZWOJÓW MIĘŚNIOWYCH ENS W JELICIE CZCZYM ŚWIŃ Z GRUPY KONTROLNEJ I PZT ORAZ WYNIKI ANALIZY MORFOMETRYCZNEJ OBEJMUJĄCEJ ŚREDNIĄ LICZBĘ NEURONÓW PRZYPADAJĄCYCH NA ZWÓJ, LICZBĘ ZWOJÓW W ANALIZOWANYM PRZEKROJU ORAZ POLE POWIERZCHNI PRZEKROJU ZWOJU..	49
RYCINA 16. REPREZENTATYWNE MIKROFOTOGRAFIE ZWOJÓW PODŚLUZÓWKOWYCH ENS W JELICIE CZCZYM ŚWIŃ Z GRUPY KONTROLNEJ I PZT	50

12. SPIS TABEL

TABELA 1. CHARAKTERYSTYKA STARTERÓW UŻYTYCH W REAKCJI QPCR	31
TABELA 2. PROTOKÓŁ BARWIENIA MASSONA	32
TABELA 3. PROTOKÓŁ PRZEPROWADZENIA REAKCJI IMMUNOHISTOCHEMICZNEJ IHC	33
TABELA 4. PODSUMOWANIE ZAOBSERWOWANYCH ZMIAN	52
TABELA 5. ZESTAWIENIE WYNIKÓW WŁASNYCH Z KLUCZOWYMI DANymi LITERATUROWYMI	66