

Akademia Medyczna im. Mikołaja Kopernika  
w Krakowie

Jolanta Pytko – Polończyk

Rozprawa doktorska

**Rola epidermalnego czynnika  
wzrostu (EGF) i ślinianek  
w procesie gojenia owrzodzeń błony  
śluzowej jamy ustnej i żołądka**

Bibl. Medyczna CM UJ



1816095264

**Promotor: Prof. dr hab. med. Stanisław J. Konturek**

Praca została wykonana w Instytucie Fizjologii  
Akademii Medycznej w Krakowie

Dyrektor Instytutu:

Prof. dr hab. med. Stanisław J. Konturek

— Kraków 1993 —

*Pragnę wyrazić głęboką wdzięczność  
Panu Profesorowi STANISŁAWOWI J. KONTURKOWI  
– promotorowi mojej pracy doktorskiej – za opiekę  
naukową, wyrozumiałość oraz za cenne, życzliwe wska-  
zówki, które miały istotny wpływ na kształt tej pracy.*

*Za okazaną mi pomoc i życzliwość  
w trakcie wykonywania badań, a także za cenne uwagi  
dotyczące redagowania tekstu pracy dziękuję Panu  
Doktorowi TOMASZOWI BRZOZOWSKIEMU.*

# SPIS TREŚCI

Wstęp . . . . .	str. 4
Cel i założenia pracy . . . . .	17
Materiał i metodyka . . . . .	19
Wyniki . . . . .	29
Dyskusja . . . . .	54
Wnioski . . . . .	68
Streszczenie . . . . .	70
Piśmiennictwo . . . . .	73

# WSTĘP

Błona śluzowa przewodu pokarmowego jest obszarem nieustannie narażonym na działanie czynników drażniących, które mogą wywoływać jej uszkodzenia. Powtarzające się ostre uszkodzenia górnego odcinka przewodu pokarmowego powodują często trudno gojące się przewlekłe zmiany w postaci nawracających owrzodzeń.

Stosunkowo często występującym schorzeniem jest wrzód trawienny żołądka. Zwykle dotyczy on ludzi w pełni aktywnych zawodowo. Szereg czynników takich jak: stresy, emocje, nieregularne odżywianie, palenie papierosów, picie alkoholu przyczynia się do osłabienia układu nerwowego jak również bezpośrednio oddziałuje na błonę śluzową, sprzyjając jej uszkodzeniom. Istotą choroby i podłożem dolegliwości jest wytworzenie się w błonie śluzowej pojedynczego lub licznych ubytków, których powstanie przypisuje się ostatecznie trawiącemu działaniu kwasu solnego i pepsyny [1]. Ubytki te mogą się utrzymywać przez dłuższy czas i pogłębiając się dochodzić, poprzez błonę śluzową i podśluzową, do warstwy mięśniowej.

Etiologia choroby wrzodowej żołądka nie jest w pełni wyjaśniona. Obecnie przyjmuje się, iż prawidłowa struktura i czynność błony śluzowej żołądka zależy od wzajemnej równowagi pomiędzy czynnikami ochronnymi i agresywnymi. Zespół czynników odpowiedzialnych za utrzymanie błony

śluzowej w prawidłowym stanie przyjęto określać mianem „bariery śluzówkowej” żołądka. Twórcą tego pojęcia, które pojawiło się w literaturze gastroenterologicznej z początkiem lat sześćdziesiątych, był Davenport [2]. „Barierę śluzówkową” stanowi zespół czynników natury czynnościowej i morfologicznej przeciwdziałających gwałtownemu wnikaniu jonów wodorowych ze światła żołądka do krwi, a jonów sodowych w kierunku przeciwnym. Anatomicznie barierę tę stanowi nabłonek powierzchni błony śluzowej złożony ze ściśle do siebie przylegających komórek. Prawidłowa struktura tłuszczowo-białkowa błony komórkowej oraz „ściśle połączenia” („tight junctions”) między komórkami hamują przenikanie substancji zjonizowanych. Łatwo jednak przepuszczają substancje niezjonizowane i rozpuszczalne w tłuszczach [3].

Kontakt śluzówki z niektórymi składnikami pokarmowymi lub lekami (np. aspiryną i innymi niesterydowymi lekami przeciwzapalnymi [4]) może prowadzić do większego złuszczenia się komórek powierzchniowych nabłonka a także do wystąpienia nadżerek i głębszych uszkodzeń. Również stres [5], substancje nekrotyzujące (np. etanol [6]), kwasy żółciowe [7] oraz roztwory hiperosmotyczne [8] mogą powodować rozległe krwotoczne uszkodzenia błony śluzowej. Zmianom tym towarzyszy utrata ciągłości nabłonka i zaburzenie bariery śluzówkowej. Destrukcja może obejmować również głębsze warstwy błony śluzowej, w tym także zaopatrujące w tlen i środki odżywiające tę błonę naczynia krwionośne.

Powierzchnowe uszkodzenie bariery śluzówkowej jest zazwyczaj odwracalne. Jednak pod wpływem powtarzającego się, długotrwałego działania czynnika drażniącego mogą powstać nieodwracalne, przewlekłe zmiany w błonie śluzowej. Może również zwiększyć się jej podatność na trawiące działanie soku żołądkowego, co z kolei tworzy podłoże do powstania wrzodu trawiennego.

W warunkach prawidłowych czynnikami ochronnymi, zapobiegającymi uszkodzeniom bariery śluzówkowej żołądka, jest szereg sprzężonych ze sobą mechanizmów takich jak ciągłe wydzielanie alkalicznego śluzu, szybka odnowa nabłonka powierzchni oraz obfity przepływ krwi [9, 10]. Również prostaglandyny (PG) chronią komórki błony śluzowej przed uszkodzeniami wywołanymi przez czynniki nekrotyzujące. Zjawisko to nazwano „cytoprotekcją” [11]. Efekt ten zachodzi niezależnie od zdolności prostaglandyn do hamowania wydzielania żołądkowego kwasu solnego i pepsyny [12]. Cytoprotekcyjny efekt prostaglandyn zachodzi poprzez wzmożenie przez te czynniki przepływu krwi w błonie śluzowej, zwiększoną produkcję ochronnego śluzu oraz pobudzenie wydzielania alkalicznego [9]. Prostaglandyny biorą również udział w usprawnianiu procesów transportu i odnowy komórkowej.

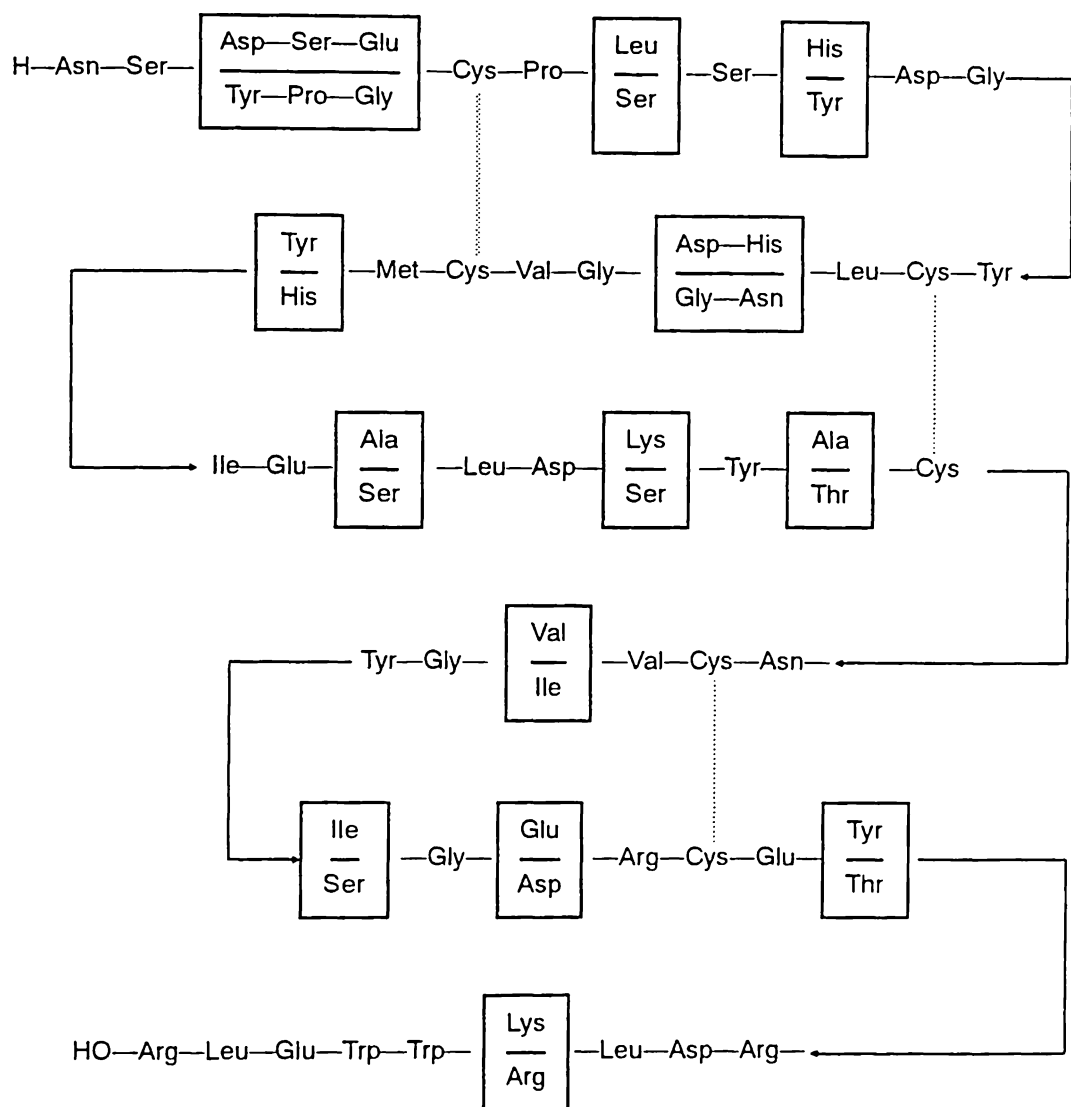
Dalsze badania nad tym zjawiskiem prowadzone w Instytucie Fizjologii AM w Krakowie [9, 13, 14, 15] dowiodły, że gastroprotekcja nie jest wyłącznie właściwością prostaglandyn i wykazują ją również inne czynniki. Zalicza się do nich epidermalny czynnik wzrostu (EGF) [16, 17], który oprócz silnych gastroprotekcyjnych właściwości przyspiesza gojenie się przewlekłych wrzodów żołądka i dwunastnicy [15], chociaż jego mechanizm działania nie jest w pełni wyjaśniony.

EGF został pierwotnie wyodrębniony przez Cohena [18], w 1962 roku, ze ślinianek podżuchwowych myszy. Cohen badał białka uwalniane po stymulacji nerwowej ze ślinianek. Zauważył, że wstrzyknięcie mysim noworodkom oczyszczonego ekstraktu z podżuchwowych gruczołów ślinowych powoduje wcześniejsze otwieranie powiek i przyspieszone wyrzynanie zębów. W roku 1965 Cohen opublikował wyniki dalszych badań [19] dowodząc, że EGF pobudza wzrost naskórka embrionów piskląt w hodowli tkankowej. Właśnie na podstawie tych badań [19] stwierdzono, że EGF stymuluje syntezę DNA i proliferację komórek naskórka. Po opracowaniu sposobu

izolacji EGF, w roku 1972, określono jego strukturę peptydową i właściwości chemiczne [20, 21, 22].

Savage i inni wykazali [23], że EGF jest polipeptydem zawierającym 53 aminokwasy, zaś Gregory ustalił, że strukturalnie peptyd ten jest identyczny z urogastronem [20, 21, 24] – innym peptydem wyodrębnionym z moczu, którego 37 aminokwasów identycznych jest z aminokwasami znajdującymi się w EGF. Z tego też powodu często stosuje się, dla podkreślenia podobnej struktury i biologicznej aktywności [25], identyczną nazwę dla obu tych substancji URO – EGF.

Wzór strukturalny tych peptydów przedstawia się następująco (różnice w składzie aminokwasowym pomiędzy EGF i urogastronem podano w ramkach):



EGF występuje jako pojedynczy polipeptydowy łańcuch o masie molekularnej liczącej około 6000 daltonów [20]. Może być także częścią większego kompleksu obecnego wewnątrz komórek nabłonkowych gruczołu ślinowego. Jego masa molekularna osiąga wówczas około 74000 daltonów.

W dalszych badaniach wykazano, że urogastron wykazuje korzystne działanie na gojenie przewlekłych owrzodzeń, oraz że efekt ten zachodzi w dawkach minimalnych – nie hamujących wydzielania kwasu



żołądkowego [26, 27, 28, 29]. EGF i urogastron są silnymi czynnikami mitogennymi zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Jak wykazano, ich działanie polega na pobudzaniu wzrostu syntezy kwasów nukleinowych w komórkach nabłonkowych żołądka [20, 30, 31].

Na podstawie badań wykazano obecność EGF w gruczołach ślinowych i ślinie [20, 32, 33, 34, 35, 36], gruczołach dwunastniczych Brunnera [35, 37, 38], a także w trzustce i soku trzustkowym [39] oraz w nerce [38], zarówno u szczurów jak i u ludzi. Stwierdzono również, że EGF występuje w dużych stężeniach w moczu [40]. Znacznie podwyższone stężenie EGF zaobserwowano także w surowicy kobiet ciężarnych [41] oraz w mleku karmiących [30].

Początkowe badania prowadzone na zwierzętach nad tkankowym rozmieszczeniem EGF wykazały, że jego głównym źródłem jest ślinianka podżuchwowa [14, 18, 42]. Na tej podstawie przypuszczano, że u ludzi sekrecja EGF do śliny zachodzi w wyniku nerwowego pobudzenia ślinianek podżuchwowych. Dopiero badania prowadzone pod kierunkiem Thesleffa przy użyciu metod immunohistochemicznych [34] wykazały, że obecny w ludzkiej ślinie EGF pochodzi przede wszystkim ze ślinianki przyusznej.

Uwalnianie EGF do śliny jest stymulowane przez VIP i układ cholinergiczny, natomiast hamowane przez pobudzanie układu adrenergicznego [43, 44]. W 1979 roku Tovey [45] stwierdził, że wydzielanie EGF jest również stymulowane mechanicznie przez żucie. Zależy ono także od stosowanej diety [46, 47].

W badaniach Guthrie i Johnsona [48], a także prowadzonych w Instytucie Fizjologii AM w Krakowie [31] wykazano, że EGF jest silnym stymulatorem syntezy DNA i RNA. Maksymalny efekt jego działania podobny jest do efektu wywołanego przez gastrynę, główny czynnik troficzny w przewodzie pokarmowym.

Badania Feldmana i innych [49] wykazały, że EGF wzmacnia aktywność dekarboksylazy ornitynowej (ODC), kluczowego enzymu biorącego udział w biosyntezie poliamin [50]. Aktywacja enzymu dekarboksylazy ornitynowej przez EGF odgrywa znaczną rolę w odnowie uszkodzonej śluzówki [50]. Stanowi w związku z tym jeden z głównych mechanizmów działania gastroprotektynowego i przeciwrzodowego EGF.

Późniejsze badania prowadzone przy użyciu nowoczesnych technik biochemicznych wykazały, że epidermalny czynnik wzrostu stymuluje komórki śluzowe żołądka do zwiększonej syntezy glikoproteidów [51, 52], będących podstawowymi składnikami ochronnego śluzu, wydzielanego przez śluzówkę żołądka i dwunastnicy. Odkrycie to może mieć duże znaczenie poznawcze, w odniesieniu do wyjaśnienia działania gastroprotektynowego EGF. Wydaje się więc bardzo prawdopodobnym, że zawarty w ślinie EGF jest ważnym fizjologicznym czynnikiem, odpowiedzialnym za ochronę błony śluzowej żołądka i dwunastnicy. Dowodzi to, że może on pełnić istotną fizjologiczną rolę nie tylko w pobudzaniu procesów proliferacji i wzrostu komórek błony śluzowej [53], ale również przyczyniać się do utrzymania integralności śluzówki żołądka [9, 17, 27, 54, 56]. Próby zastosowania EGF w leczeniu przewlekłych wrzodów żołądka [28, 55] i dwunastnicy [26, 28, 29] wykazały, że przyspiesza on gojenie tych wrzodów.

Rola czynników pośredniczących w ochronnych i przeciwrzodowych efektach EGF nie jest w pełni poznana. Prawdopodobnie prostaglandyny, klasyczne autakoidy ochronne, nie odgrywają większej roli, gdyż EGF zapobiega także powstawaniu wrzodów spowodowanych przez aspirynę pomimo, że biosynteza prostaglandyn jest wówczas całkowicie zahamowana [16, 17]. Badania te kwestionują więc udział endogennych prostaglandyn jako głównych mediatorów w mechanizmie działania EGF. Prace Olsena i współpracowników [27, 29] wskazują na cytoprotekcyjne działanie śliny

i EGF. Okazało się bowiem, iż EGF w dawkach nie hamujących wydzielania kwasu żołądkowego osłania błonę śluzową przed powstawaniem wrzodów dwunastniczych, indukowanych cysteaminą. Wykazano również [55, 56], że usunięcie gruczołów ślinowych prowadzi do znacznego spadku endogennego EGF oraz do zaniku błony śluzowej żołądka [56], a efektem tym można zapobiec podając egzogeny EGF.

Owrzodzenia błony śluzowej jamy ustnej mają odmienną etiologię od uszkodzeń żołądkowo-jelitowych. Można je podzielić na cztery grupy: urazowe, o podłożu ogólnym, infekcyjne i nowotworowe [57, 58, 59].

Owrzodzenia urazowe powstają na skutek działania czynników mechanicznych, termicznych i chemicznych. Mogą być również wywołane działaniem prądu elektrycznego, promieniami Roentgena i radem. W grupie tej najczęstszą przyczyną jest uraz mechaniczny. W praktyce klinicznej zaobserwowano uszkodzenia powierzchowne obejmujące tylko nabłonek błony śluzowej oraz uszkodzenia głębokie, połączone z objęciem całej błony śluzowej i podśluzowej. Stwierdzono ich zależność od rodzaju czynnika mechanicznego i siły jego działania. Zmiany pochodzenia mechanicznego powstają na skutek jednorazowego działania urazu o dużej sile (ostry uraz mechaniczny), bądź wielu słabych urazów działających przez dłuższy okres czasu (przewlekły uraz mechaniczny).

Jednymi z najczęściej występujących zmian urazowych o charakterze owrzodzeniowym są odleżyny. Spowodowane są one m.in. użytkowaniem protez zębowych. Źle wykonane bądź nieodpowiednio dopasowane uzupełnienia protetyczne, protezy uszkodzone, rozchwiane i długo noszone są przyczyną powstawania ubytków (początkowo płytkich, przy dłuższym działającym bodźcu – drażących w głąb tkanek, o wyraźnych zarysach, zgrubiałych brzegach, wznoszących się poza otaczającą błonę śluzową). Owrzodzenia te są różnej wielkości i kształtu, dno ich pokryte jest szarym nalotem lub

szaro-żółtą wydzieliną. Często towarzyszy tym zmianom ból, zwłaszcza przy spożywaniu pokarmów. Owrzodzenie odleżynowe tworzy się również przy długotrwałym drażnieniu przez ostre brzegi ubytków próchnicowych, nawisające wypełnienia, pojedyncze zęby stojące w łuku czy też zęby stojące poza łukiem zębowym.

Czynnikami sprzyjającymi powstawaniu owrzodzeń odleżynowych są choroby krwi i układu krążenia, choroby przemiany materii, zaburzenia w trofice błony śluzowej i niedobory witamin. Owrzodzenia występują w hipowitaminozie i awitaminozie PP, awitaminozie C, a także w chorobach z niedoborem kwasu foliowego i witaminy B<sub>12</sub>. Najczęściej mają one charakter rozległego zapalenia jamy ustnej z owrzodzeniami.

Do grupy owrzodzeń urazowych należy włączyć także afty Bednara, występujące u niemowląt, a spowodowane zbyt energicznym oczyszczaniem przez matki błony śluzowej jamy ustnej niemowlęcia.

Owrzodzenia powstałe w wyniku działania czynnika termicznego zdarzają się najczęściej u małych dzieci (oparzenia gorącymi posiłkami) i u dorosłych, którzy z racji wykonywanych zawodów narażeni są na oparzenia błony śluzowej (kucharze, cukiernicy). Oparzenia I i II stopnia występujące w tej grupie przebiegają wraz z dolegliwościami bólowymi, a nierzadko towarzyszą tym zmianom powikłania w postaci wtórnych zakażeń.

Częstymi uszkodzeniami błony śluzowej a szczególnie warg są owrzodzenia pochodzenia świetlnego wywołane promieniami słonecznymi. Zdarzają się one u ludzi narażonych na długotrwałe działanie słońca tj. u rolników, marynarzy i robotników drogowych.

Owrzodzenia jamy ustnej powstałe pod wpływem działania środków chemicznych spowodowane są kontaktem śluzówki ze stężonymi kwasami, zasadami lub ich solami (uszkodzenia spotykane u laborantów), a także działaniem na błonę śluzową niektórych leków: aspiryny, środków

przyżegających (np. wysokoprocentowy roztwór azotanu srebra), środków służących do dewitalizacji miazgi zębowej (trójtlenek arsenu), obecnie nie stosowanych. Owrzodzenia mogą powstać nie tylko na skutek bezpośredniego działania związków chemicznych, ale również w wyniku długotrwałego podawania niektórych leków, np. barbituranów, izoprenaliny, cytostatyków [59, 60, 61, 62], antybiotyków (streptomycyna) lub specyfików stosowanych w leczeniu chorób reumatycznych (antypiryna, butazolina).

Uszkodzenia wywołane promieniami Roentgena i radu stosowanymi w celach terapeutycznych, spotyka się jako zmiany występujące bezpośrednio lub po pewnym okresie czasu od przeprowadzonego leczenia nowotworów [57]. Są to zmiany bolesne, z nieznacznym odczynem zapalnym, charakteryzujące się zwykle długim okresem gojenia.

Owrzodzenia błony śluzowej jamy ustnej o podłożu ogólnym towarzyszą m.in. chorobom krwi i układu krwiotwórczego [57]. Szczególnie uwidaczniają się w białaczkach ostrych, dotyczą głównie dziąseł, warg, języka i migdałków. Są one pokryte nalotem lub tkanką martwiczą, bardzo bolesne, zwłaszcza przy dotyku, utrudniają przyjmowanie pokarmów. Ciężkie, rozległe owrzodzenia pojawiają się w agranulocytozie, uniejskawiając się na migdałkach, łukach podniebiennych, podniebieniu, dziąsłach i policzkach.

Do grupy owrzodzeń o podłożu ogólnym zaliczyć należy także owrzodzenia troficzne i neurotroficzne. Te pierwsze występują po znieczuleniach nasiękowych, spowodowane są uciskiem wstrzykniętego płynu lub zakrzepem w naczyniu krwionośnym, powodującym niedokrwienie tkanek (najczęściej zakrzep tętnicy podniebiennej) [63]. Z owrzodzeniami neurotroficznymi mamy do czynienia przy znieczuleniach blokujących nerwy czuciowe i przy jednoczesnym działaniu urazu. Uszkodzenia te mają nieregularny kształt, dużą dynamikę szerzenia się obwodowo i w głąb, podminowane brzegi, pokryte martwiczymi masami dno oraz nierzadko towarzyszą im ob-

nażenia kości czy perforacje tkanek miękkich. Umiejscawiają się one głównie na dziąsłach, języku, podniebieniu, dnie jamy ustnej i policzkach.

Zmiany na błonie śluzowej jamy ustnej uwidaczniają się również w przebiegu niektórych chorób zakaźnych m.in. błonicy (zajęte są wtedy najczęściej dziąsła, policzki, kąty ust oraz wargi) i ospy wietrznej (dość rozległe owrzodzenia powstają przy zlewniej postaci osutki pęcherzykowej).

Schorzenia dermatologiczne takie jak zapalenie skóry i jamy ustnej Baadera (dermatostomatitis Baaderi) czy pęcherzyce, przebiegają z ostrymi zmianami w jamie ustnej i owrzodzeniami pojawiającymi się na języku, dziąsłach, policzkach, dnie jamy ustnej, podniebieniu twardym i miękkim oraz gardle. Liszaj płaski Wilsona, jak również rumień wielopostaciowy znamionują się występowaniem powierzchniowych, lecz rozległych i bolesnych owrzodzeń [64, 65, 66].

Najczęściej spotykanymi owrzodzeniami błony śluzowej, w grupie owrzodzeń o podłożu ogólnym, są afty Suttona (peradenitis mucosae necrotica recurrens) – ciężka postać aft nawrotowych, o wieloprzyczynowym podłożu [57]. Afty te w postaci dość głębokich, kraterowatych owrzodzeń z nacieczonymi brzegami i obrzękiem podłoża [67] umiejscawiają się głównie w otoczeniu drobnych gruczołów ślinowych w obrębie warg, policzków, łuków podniebiennych i języka. Są one bardzo bolesne, utrzymują się 4 – 6 tygodni, a nawet dłużej, pozostawiając po wygojeniu małe, zaciągające blizny, utrudniające mówienie i żucie [68].

Trzecia grupa owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej to owrzodzenia infekcyjne. Zaliczymy do niej zmiany powstałe na śluzówce w przebiegu kiły, gruźlicy, nieswoistych zakażeń bakteryjnych, chorób grzybiczych i wirusowych [57].

Owrzodzenie w kile pierwotnej jest twarde, nacieczone, dno jego jest błyszczące, jakby wylakierowane, różowe lub czerwono-miedziane.

Zmiana występuje głównie na wargach, języku i dziąsłach, jest okrągła lub owalna, na dziąśle – półksiężycowata. Jest ona pojedyncza, powoduje ból przy zetknięciu z twardymi, kwaśnymi czy słonymi pokarmami.

W przypadkach gruźlicy pierwotnej owrzodzenie jest płytkie, pokryte ziarniną lub białym nalotem, mało bolesne. Owrzodzenie towarzyszące gruźlicy popierwotnej – właściwej (u chorych z czynną gruźlicą płuc) umiejscawia się głównie na wardze, języku, policzkach i w gardle [57, 66]. Cechują je nieregularne brzegi, nierówne, poszarpane dno – z żółtymi miękkimi ziarnistościami Trelata. Odznacza się dużą, trudną do zniesienia, bolesnością, do bólu dołącza się dodatkowo pieczenie, zaznaczające się zwłaszcza przy spożywaniu pokarmów słodkich i słonych.

W chorobach wirusowych najczęstszą przyczyną owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej był wirus krowianki. Z powodu braku zachorowań choroba ta nie figuruje obecnie w rejestrze WHO.

Zmiany o charakterze owrzodzeń występują często w przebiegu chorób nowotworowych. Obraz kliniczny tych owrzodzeń jest niejednorodny. Owrzodzenia mogą być niebolesne [69], stan węzłów chłonnych zależy od zaawansowania choroby.

Reasumując, opisane wyżej owrzodzenia są różnej wielkości, kształtu, różnej głębokości, dotyczą różnego umiejscowienia na błonie śluzowej jamy ustnej. Z racji umiejscowienia w jamie ustnej i możliwości narażenia na ciągłe drażnienie w czasie spożywania pokarmów oraz częste wywiązywanie się infekcji wywołanej przez florę bakteryjną jamy ustnej, bolesność tego typu owrzodzeń jest stosunkowo duża. Brak jest zupełnie informacji o patomechanizmie powstawania tych uszkodzeń i roli czynników fizjologicznych biorących udział w gojeniu owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej oraz ewentualnie czynników i mechanizmów, które pośredniczą w tym procesie.

Jeżeli EGF odgrywa rolę naturalnego czynnika ochraniającego błonę śluzową żołądka, to wyjaśnienia wymagałby mechanizm przeciwo-rzodzeniowego działania EGF w odniesieniu do błony śluzowej jamy ustnej. Nieliczne dotąd próby kliniczne [70] dowiodły, że stosowanie EGF u ludzi wspomaga gojenie się wrzodów żołądka. Stwierdzono również, że ślina pobrana od pacjentów z czynnym wrzodem dwunastnicy zawiera mniej EGF [71], co może być czynnikiem patogenetycznym w rozwoju wrzodu i wskazywać na istotną rolę tego czynnika w mechanizmach utrzymujących integralność błony śluzowej zarówno żołądka, dwunastnicy jak i jamy ustnej.

Niektórzy chorzy z reumatoidalnym zapaleniem stawów wykazują zmniejszone wydzielanie śliny i obniżoną zawartość w niej EGF [72]. Chorzy ci są szczególnie narażeni na rozwój uszkodzeń trawiennych w przewodzie pokarmowym, zwłaszcza w warunkach pobierania drażniących leków takich jak niesterydowe środki przeciwzapalne, które stanowią dodatkowy czynnik uszkadzający dla błony śluzowej tego przewodu.



# CEL I ZAŁOŻENIA PRACY

Liczne badania doświadczalne i kliniczne mają na celu wykrycie skutecznych leków, zapobiegających występowaniu wrzodów błony śluzowej jamy ustnej i żołądka lub przyspieszających ich gojenie.

Przewlekłość owrzodzeń i ich nawrotowy charakter sugerują potrzebę zastosowania nie tylko leków przyspieszających gojenie poszczególnych zmian, ale również leków cytoprotekcyjnych [9, 73], które działają zapobiegawczo i chronią błonę śluzową przed szkodliwymi czynnikami uszkadzającymi.

W świetle przedstawionych we wstępie wyników badań nie została w pełni określona rola oraz mechanizm działania EGF w procesie gojenia się wrzodów żołądka i dwunastnicy. Ponadto brak jest zupełnie opracowań na temat udziału tego czynnika w powstawaniu i gojeniu się owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej.

Zarówno mechanizm działania jak i rola fizjologiczna EGF w gojeniu przewlekłych uszkodzeń jamy ustnej nie są znane.

Celem mojej pracy było:

1. Opracowanie modelu doświadczalnego wywoływania przewlekłych owrzodzeń jamy ustnej i – porównawczo – owrzodzeń żołądka oraz wykazanie znaczenia EGF w procesie gojenia się tych zmian.

2. Prześledzenie dynamiki gojenia wrzodów języka i żołądka u zwierząt zarówno z zachowanymi jak i usuniętymi śliniankami – głównym endogennym źródłem EGF.
3. Podawanie szczurom z zachowanymi lub usuniętymi śliniankami egzogenego EGF, aby przekonać się, czy peptyd ten stosowany doustnie ma wpływ na szybkość gojenia wywołanych wrzodów.
4. Wykazanie czy istnieje korelacja między gojeniem przewlekłych owrzodzeń na śluzówce języka i w żołądku a przepływem krwi w miejscu owrzodzenia.
5. Wyjaśnienie czy  $\alpha$ -difluorometyloornityna (DFMO) – czynnik hamujący produkcję endogennych poliamin [15], wpływa na szybkość gojenia się wrzodów języka i żołądka.
6. Zbadanie czy indometacyna – środek hamujący biosyntezę prostaglandyn [16, 17] – wpływa na proces gojenia owrzodzeń języka lub wrzodów żołądka.

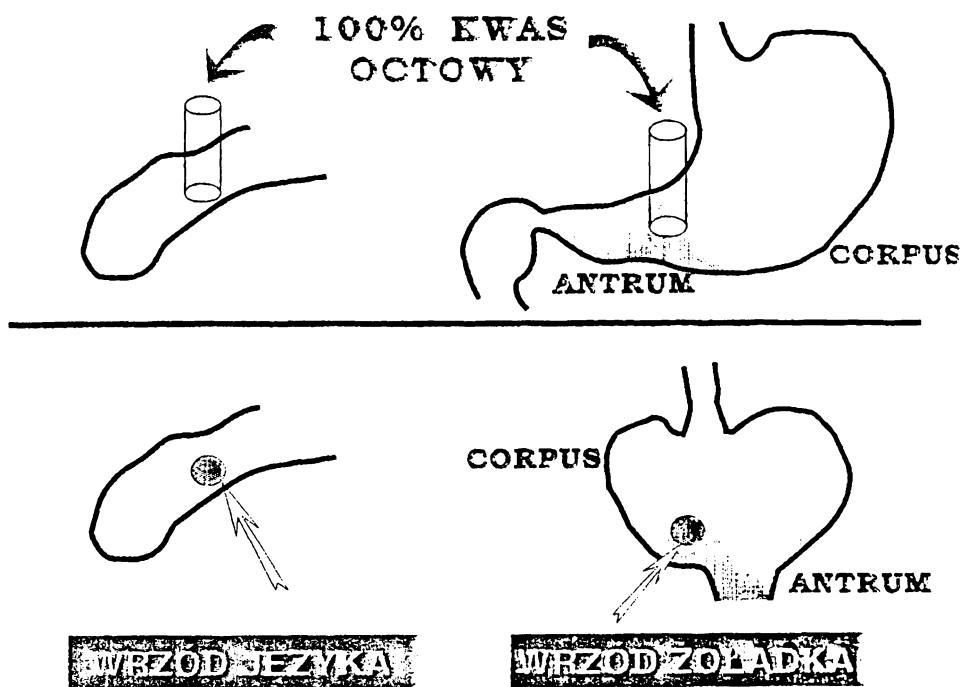
# MATERIAŁ I METODYKA

## 1. Dane ogólne

Badania przeprowadzono na 380 szczurach białych płci mieszanej rasy Wistar o wadze 220 – 300 g. Zwierzęta (w większości 3-miesięczne szczury) przebywały w klatkach w dobrze oświetlonym i wietrzonym pomieszczeniu. Karmiono je standardowym granulatem, w warunkach swobodnego dostępu do wody pitnej. Wszystkie eksperymenty rozpoczynano w godzinach rannych pomiędzy 9<sup>00</sup> a 10<sup>00</sup>.

## 2. Wywoływanie wrzodów octowych w żołądku i na języku

Do wywoływania wrzodów używałam stężonego (100%) kwasu octowego, zgodnie z oryginalną metodą zaproponowaną przez Okabe i Pfeiffera [74] a zmodyfikowaną w trakcie badań prowadzonych w Instytucie Fizjologii AM w Krakowie [14]. W wyniku zastosowania tej eksperymentalnej techniki, w miejscu gdzie przyłożono kwas na błonę surowiczą żołądka powstawała nekroza głębiej położonej błony śluzowej, podśluzowej i rozwijał się wrzód. Po dwóch dniach uszkodzenia te nabierały charakteru wrzodów przewlekłych, obejmujących całą grubość błony śluzowej i podśluzowej, sięgając



Ryc. 1. Schemat wywoływania wrzodów języka i żołądka przy użyciu 100% kwasu octowego.

do warstwy mięśniówki błony śluzowej (muscularis mucosae). Wrzody wywoływane według tej metody, goją się samoistnie w ciągu 2-3 tygodni, co stwarza możliwość badania dynamiki ich gojenia w stosunkowo krótkim czasie oraz oceny działania różnych czynników fizjologicznych i leków na szybkość tego procesu.

Wybrane do wywołania uszkodzeń zwierzęta usypiałam pentobarbitem (Evipan Natrium), podawanym dootrzewnowo w ilości 60 mg/kg i układałam na stoliku operacyjnym. Następnie skalpelem chirurgicznym przecinałam znarkotyzowanym zwierzętom skórę i powłoki brzuszne w linii środkowej ciała. Ostrożnie wyjmowałam żołądek zwracając uwagę na naczynia

i tkankę sieciową. W ten sposób uwidaczniała się granica między częścią trzonową i antralną na przedniej ścianie żołądka, dzięki czemu można było u każdego zwierzęcia indukować uszkodzenie w tym samym miejscu i tej samej wielkości. (Ryc. 1).

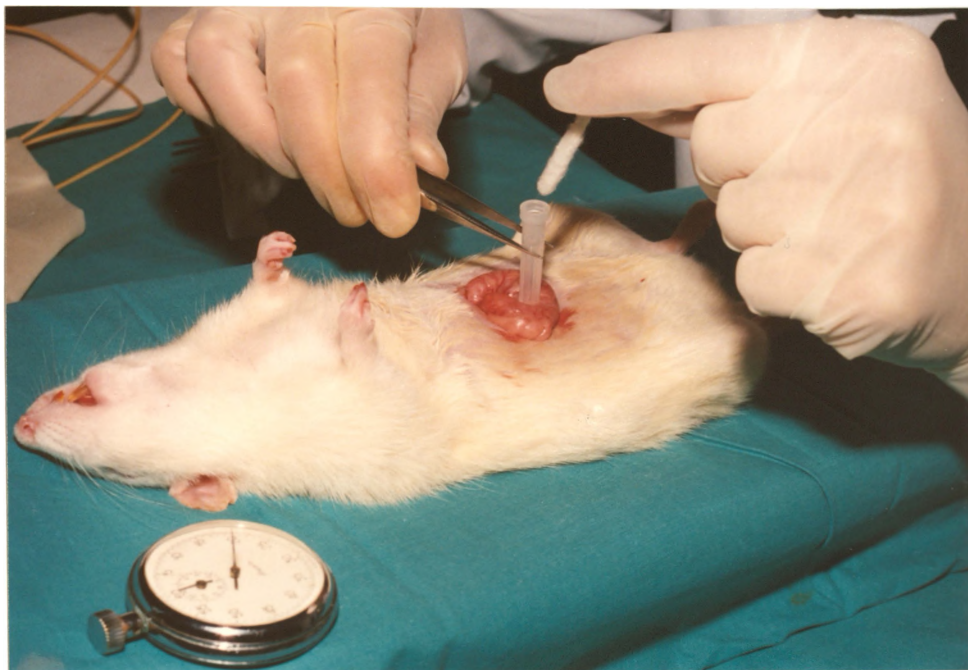
Wrzody żołądkowe wywoływałam, przykładając standardową plastikową rurkę o średnicy wewnętrznej 4,2 mm, wypełnioną następnie 70  $\mu$ l kwasu octowego i pozostawiając tę objętość w kontakcie z surowicówką przez okres 20 sekund (Ryc. 2).



Ryc. 2. Aplikacja kwasu octowego na powierzchnię błony surowiczej żołądka przy użyciu plastikowej rurki, przyłożonej pomiędzy częścią antrum a częścią trzonową żołądka.

Po tym czasie kwas starannie usuwałam wacikiem (Ryc. 3).

Następnie surowicówkę żołądka przemywałam solą fizjologiczną, osuszałam gazą i zamykałam jamę brzuszną przy pomocy nici chirurgicznych



Ryc. 3. Usuwanie, przy pomocy wacika, nadmiaru kwasu octowego z miejsca aplikacji.

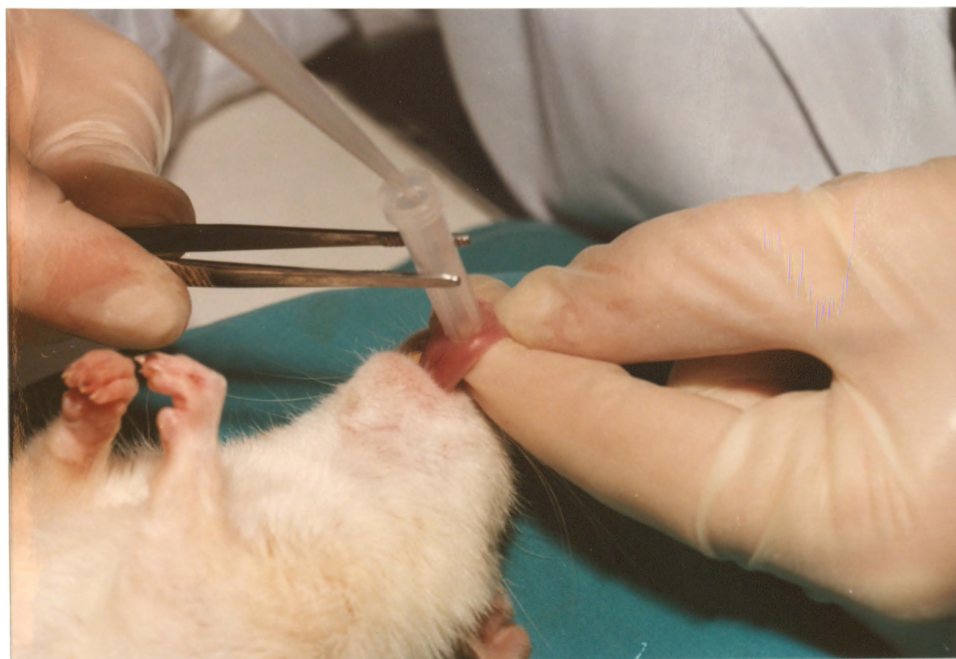
(Dexon 5-0), zakładając szwy chirurgiczne – osobno na otrzewną, mięśnie i skórę.

W celu zbadania dynamiki gojenia wrzodów o różnych rozmiarach używałam także rurki plastikowej o średnicy wewnętrznej 3,0 lub 6,0 mm, stosując każdorazowo ten sam czas działania kwasu na błonę surowiczą żołądka.

Według metody Okabe i współpracowników [74] przyłożenie niewielkiej ilości kwasu octowego do błony surowiczej na dłuższy okres (np. 1 min.) lub podśluzówkowa iniekcja tego kwasu (około 30  $\mu$ l) prowadzą do powstawania trudno gojących się chronicznych wrzodów. Proces ich gojenia trwa kilka miesięcy z możliwością nawrotu. Niedogodnością tej metody jest fakt, że wywołane w ten sposób przewlekłe wrzody często ulegają perfo-

racji i penetrują do sąsiadujących z żołądkiem narządów, głównie do wątroby i śledziony. Aby uniknąć powikłań skróciłam czas opisanej wcześniej ekspozycji kwasu na błonę surowicówki do 20 sekund i bezpośrednio po jego usunięciu przemywałam tę błonę letnią solą fizjologiczną, aby pozbawić ją kontaktu z kwasem. W wyniku zastosowania tych modyfikacji niemal całkowicie wyeliminowałam występowanie perforacji i jej skutków.

W dalszej części pracy, wykorzystałam wyżej opisaną metodę do wywoływania owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej. Eksperyment ograniczyłam do błony śluzowej języka. Do brzusznej części języka przykładam szczelnie, podobnie jak w żołądku, plastikową rurkę o średnicy wewnętrznej 4,2 mm (z powodu mniejszej powierzchni języka nie stosowałam, jak miało to miejsce w przypadku żołądka, rurki o średnicy 6 mm) i wypełniałam ją 70  $\mu$ l kwasu octowego. Utrzymywałam w ten sposób kwas w zetknięciu z błoną

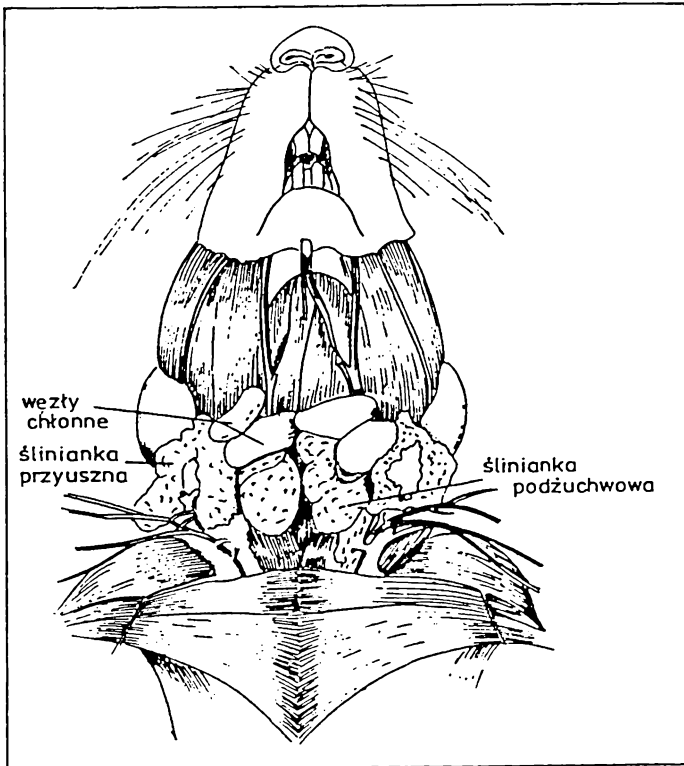


**Ryc. 4.** Wywoływanie owrzodzeń języka przy użyciu kwasu octowego utrzymywanego na powierzchni błony śluzowej za pośrednictwem rurki plastikowej.

śluzową języka przez okres 1 minuty, po czym język osuszałam i przemywałam letnim roztworem soli fizjologicznej, postępując podobnie jak przy wywoływaniu wrzodów żołądkowych (Ryc. 4.).

### 3. Usuwanie gruczołów ślinowych

W celu dokonania sialoadenektomii szczury poddawałam narkozie stosując dootrzewnowo pentobarbital w ilości 60 mg/kg. Po unieruchomieniu zwierzęcia na stoliku operacyjnym, przecinałam skórę okolicy szyjnej powyżej górnego brzegu mostka. Rozsuwając powłoki mięśniowe, odsłania-



Ryc. 5. Schemat przedstawiający zespół ślinianek (szczura), które usuwano w narkozie pentobarbitalowej.



łam gruczoły ślinowe, podwiązywałam tętnicę i żyłę śliniankową. Za pomocą pincety chirurgicznej usuwałam najpierw ślinianki podżuchwowe i podjęzykowe, a później przyuszne (Ryc. 5.). Miejsce zabiegu lokalnie posypywałam antybiotykiem (Chlorocid, Polfa) i zabezpieczałam szwem chirurgicznym, a skórę w odcinku szyjnym odkażałam płynem z dodatkiem 50% etanolu. Szczury pozostawały w klatkach przez okres 8-10 dni od zabiegu, po czym wywoływałam u nich wrzody na języku lub w żołądku postępując identycznie jak w przypadku zwierząt z nienaruszonymi śliniankami.

#### 4. Przebieg eksperymentu

Owrzodzenia na języku wywołałam u 180-ciu zwierząt, podzielonych na dwie grupy. Pierwsza obejmowała te z zachowanymi gruczołami ślinowymi, a więc szczury, u których tylko przecinano skórę (rzekoma operacja). Drugą grupę stanowiły zwierzęta z usuniętymi śliniankami.

Przed rozpoczęciem badań obie grupy podzieliłam dodatkowo na 5 podgrup, którym podawano odpowiednio:

- A — EGF w dawce 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ -dzień doustnie (p.o.);
- B — DFMO ( $\alpha$ -difluorometyloornityna) w dawce 200 mg/kg-dzień dootrzewnowo (i.p.);
- C — kombinację DFMO w dawce 200 mg/kg-dzień (i.p.) wraz z EGF w dawce 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ -dzień (p.o.);
- D — indometacynę w dawce 2 mg/kg-dzień dootrzewnowo (i.p.);
- E — stanowiąca grupę kontrolną, która nie otrzymywała żadnych preparatów.

Każda podgrupa liczyła 8-10 zwierząt. EGF rozpuszczałam w 0,9% roztworze NaCl i podawałam w wodzie do picia, uwzględniając wcześ-

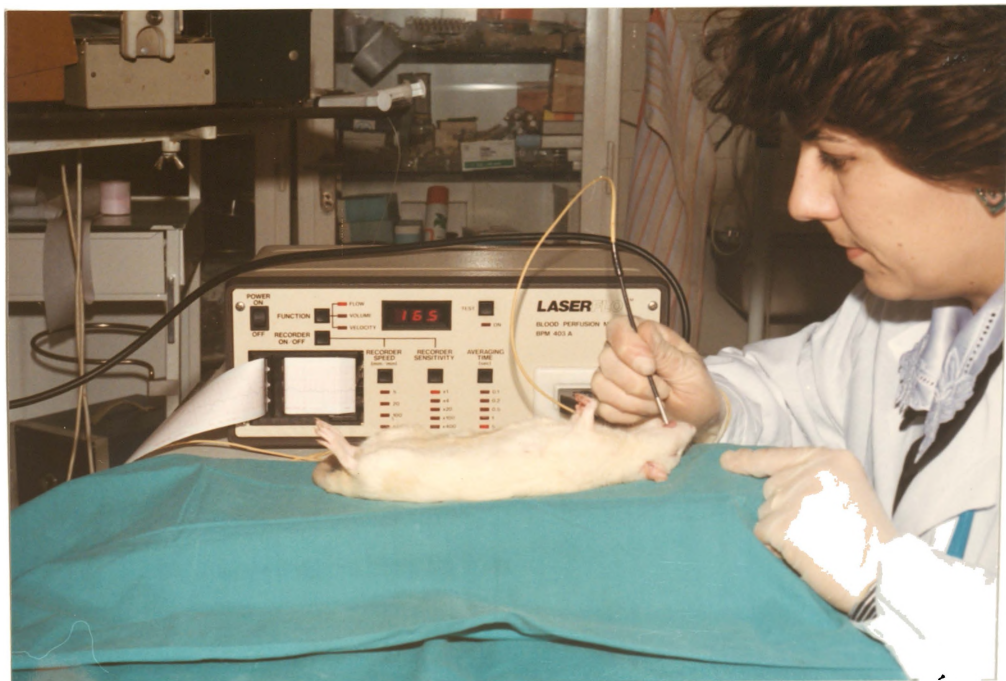
niejsze własne obserwacje, że spożycie dzienne wody przez szczura o wadze 250 g wynosi średnio 30 ml.

Wrzody żołądkowe wywołałam u 200-tu zwierząt i dokonałam analogicznego podziału na grupy i podgrupy jak w przypadku szczurów z owrzodzeniami językowymi. Zwierzęta otrzymywały testowane preparaty w ilości identycznej jak szczury z owrzodzeniami na języku, stosując DFMO i indometacynę w iniekcji dootrzewnowej, zaś dzienną ilość EGF rozpuszczałam w wodzie pitnej.

## **5. Pomiar przepływu krwi w mikrokrażeniu błony śluzowej języka oraz żołądka**

Badanie przepływu krwi przeprowadzałam przy pomocy przepływomierza laserowego Dopplera (Laserflow, Vasamedics, St Paul, MN, USA). Zasada działania tego przyrządu opiera się na pomiarze miejscowych zmian przepływu krwi z uwzględnieniem ruchu krwinek i objętości przepływającej krwi. Główną część aparatu stanowi zgłębnik światłowodowy, który przekazuje do monitora zmiany szybkości przepływu krwi w naczyniach błony śluzowej w momencie zetknięcia końcówki zgłębnika z powierzchnią zaopatrywaną przez te naczynia. Wartości przepływu wyświetlane są na czytniku elektronicznym, a odczyty wyraża się w ml/min/100 g tkanki (Ryc. 6.).

W celu wykonania pomiaru przepływu krwi w poszczególnych podgrupach szczury płytko narkotyzowałam eterem i wykonywałam badania bezpośrednio po wywołaniu wrzodu oraz co drugą dobę w okresie trwania doświadczenia, przyjmując jako dzień „0” ten, w którym wywołano owrzodzenie. Przepływ krwi mierzyłam w dniu owrzodzenia, na jego brzegu, a także w zdrowej, nie zmienionej części błony śluzowej języka oraz żołądka.



Ryc. 6. Pomiar przepływu krwi metodą laserową.

## 6. Pomiar rozległości uszkodzeń

W drugim, czwartym, szóstym, ósmym i jedenastym dniu po wywołaniu wrzodów, zarówno na języku jak i w żołądku, szczury usypiałam, żołądki usuwałam i rozcinałam wzdłuż krzywizny większej. Następnie mierzyłam wielkość wrzodów stosując przyrząd Morphomat 10 (Carl Zeiss, Niemcy), działający na zasadzie planimetru. Wielkość owrzodzeń językowych oznaczałam posługując się tym samym przyrządem.

## 7. Histologiczne badanie śluzówki języka i żołądka

W szóstym i jedenastym dniu pobierałam od niektórych szczurów wycinki tkanek z miejsca owrzodzenia, zarówno języka jak i żołądka oraz fragmenty zdrowej tkanki. Skrawki tkanki zanurzałam, bezpośrednio po wy-

cięciu w celu utrwalenia, do 10% formaliny, zbuforowanej do pH = 7. Następnie przekazywałam ten materiał do pracowni histologicznej Katedry Patomorfologii Akademii Medycznej w Krakowie. Preparaty histologiczne wykonano pod kierunkiem prof. J.Stachury używając standardowej techniki barwienia hematoksyliną i eozyną. Każdy preparat oceniany był trzykrotnie przez dwóch histologów, którzy nie znali tematów poszczególnych eksperymentów.

## **8. Statystyczne opracowanie wyników**

Analizę statystyczną wykonano w oparciu o test t-Studenta [75]. Wszystkie wyniki podawano jako średnie  $\pm$  wartości odchylenia standardowego, za statystycznie znamienne uznając te, których wartości  $P < 0,05$ .

## **9. Preparaty użyte do eksperymentu**

EGF – ICI, Alderley Park, Anglia.

Indometacyna – Polfa, Polska.

DFMO – Merrell Dow Research Institute, Cincinnati, Ohio, USA.

Chlorocid – Polfa, Polska.

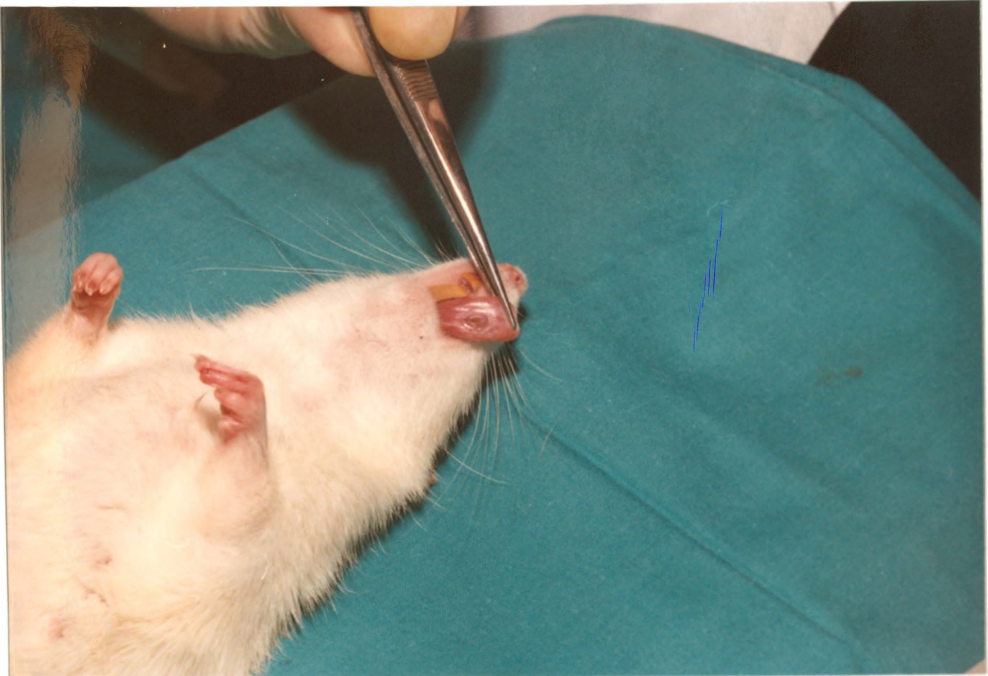
Evipan Natrium – Polfa, Polska.

Eter – Polfa, Polska.

# WYNIKI

## 1. Badanie szybkości gojenia się owrzodzeń języka

Rycina 7 przedstawia uszkodzenie wywołane kwasem octowym bezpośrednio po jego zadziałaniu na błonę śluzową u podstawy języka. Na-



Ryc. 7. Obraz makroskopowy uszkodzenia błony śluzowej języka bezpośrednio po zastosowaniu kwasu octowego.



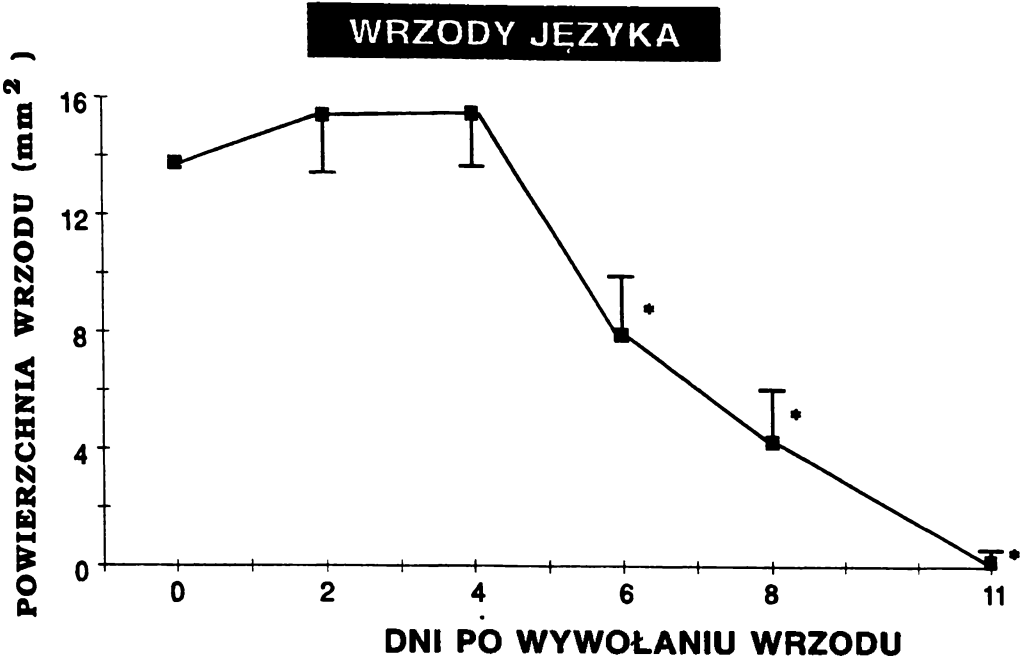
Ryc. 8. To samo uszkodzenie co na Ryc. 7 w postaci zmiany nekrotycznej (zdjęcie wykonane dwa dni po wywołaniu owrzodzenia).

stępane zdjęcie (Ryc. 8.) obrazuje to samo owrzodzenie widoczne dwa dni po jego wywołaniu.

Rycina 9 obrazuje zmiany powierzchni owrzodzeń języka w 2, 4, 6, 8, 11-tym dniu po wywołaniu uszkodzenia. Jego powierzchnia w 2-gim dniu uległa podwyższeniu średnio z  $13,8 \text{ mm}^2$  do  $15,5 \pm 2,0 \text{ mm}^2$ , chociaż nie był to wzrost znamieny statystycznie.

W 4-tym dniu po wywołaniu uszkodzenia utrzymywał się również podobny nieznamieny statystycznie wzrost powierzchni uszkodzenia.

W 6-tym dniu odnotowałam statystycznie znamienne zmniejszenie powierzchni owrzodzenia do wartości  $8,0 \pm 2,0 \text{ mm}^2$  (powierzchnia owrzodzenia zmalała o około 42% w stosunku do powierzchni wyjściowej w dniu „0”). W 8-mym dniu zaobserwowałam dalsze zmniejszenie powierzchni



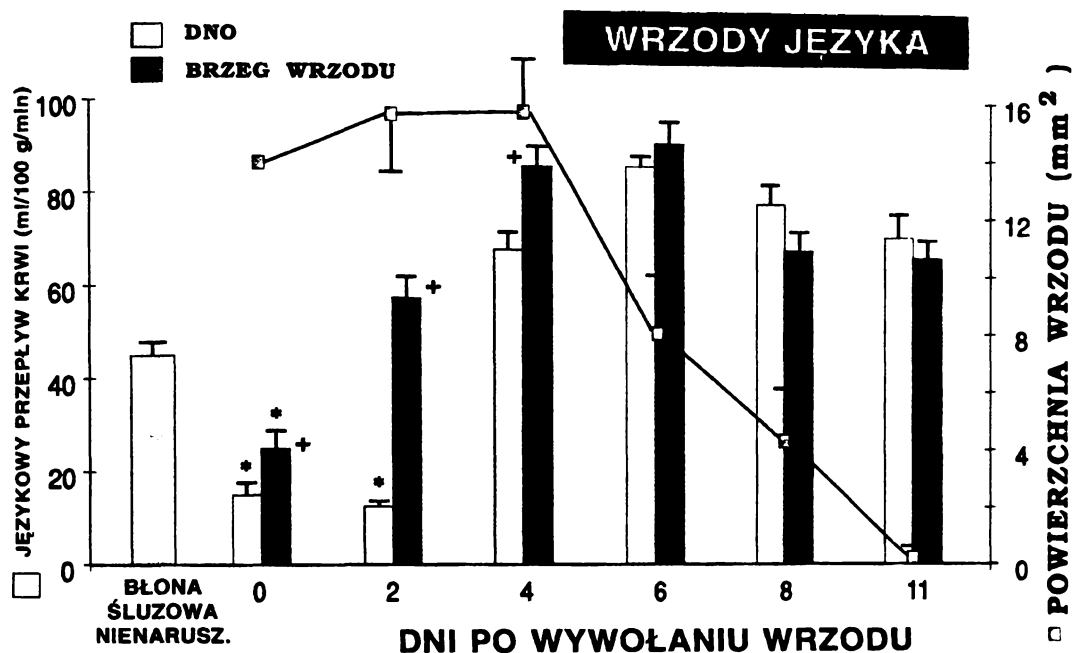
Ryc. 9. Zmiany wielkości owrzodzeń języka od „0” do 11-go dnia po ich wywołaniu. Gwiazdki oznaczają znamiennej statystycznie ( $P < 0,05$ ) różnicę w porównaniu z powierzchnią uszkodzenia w dniu „0”.

uszkodzenia – do wartości  $4,3 \pm 1,8 \text{ mm}^2$  (spadek o około 69% w stosunku do powierzchni wyjściowej).

W 11-tym dniu po wywołaniu owrzodzenia stwierdziłam obecność blizny, świadczącej o całkowitym wygojeniu się zmiany.

## 2. Badanie przepływu krwi w mikrokrążeniu błony śluzowej języka

Rycina 10 przedstawia wzajemną relację pomiędzy powierzchnią owrzodzenia języka a przepływem krwi w jego dnie i na brzegu w kolejnych dniach obserwacji po wywołaniu wrzodu. Przepływ krwi w nie uszkodzonej



Ryc. 10. Przepływ krwi (w postaci słupków) w nie uszkodzonej błonie śluzowej języka oraz w dniu i brzegu owrzodzenia w różnych dniach badania po jego wywołaniu. Linia ciągła oznacza zmiany wielkości powierzchni owrzodzenia w poszczególnych dniach badania. Gwiazdkami oznaczono statystycznie znaczne ( $P < 0,05$ ) zmniejszenie wartości przepływu krwi w stosunku do danych uzyskanych w zdrowej śluzówce. Krzyżyki obrazują znamienne statystycznie ( $P < 0,05$ ) wzrost przepływu krwi w stosunku do wartości kontrolnej.

błonie śluzowej języka wynosił  $45 \pm 2,5$  ml/min/100 g. Zastosowanie kwasu octowego na błonę śluzową języka powoduje natychmiastowy spadek przepływu zarówno w dniu jak i na brzegu uszkodzenia, osiągając wartości odpowiednio  $15 \pm 2,5$  i  $25 \pm 4$  ml/min/100 g (zmniejszył się w dniu o 66,7%, zaś w brzegu o 44,5% w stosunku do kontrolnego przepływu w nie zmienionej błonie śluzowej języka).

W 2-gim dniu przepływ krwi w dniu wrzodu utrzymywał się na podobnym poziomie jak w dniu „0”. Tymczasem jego wartość na brzegu uszkodzenia podniosła się do  $57,5 \pm 4,5$  ml/min/100 g. Stanowiło to znamien-



ny statystycznie wzrost o 380% w stosunku do wartości przepływu mierzonego w dniu w dniu "0".

W 4-tej dobie przepływ w dniu uległ znamiennej podwyższeniu w stosunku do 2-giego dnia, wciąż jednak wykazując znamienne statystycznie niższą wartość, niż przepływ w brzegu uszkodzenia. W 4-tym dniu odnotowałam dalszy wzrost przepływu, o około 50%, w stosunku do wartości rejestrowanej w dniu drugim.

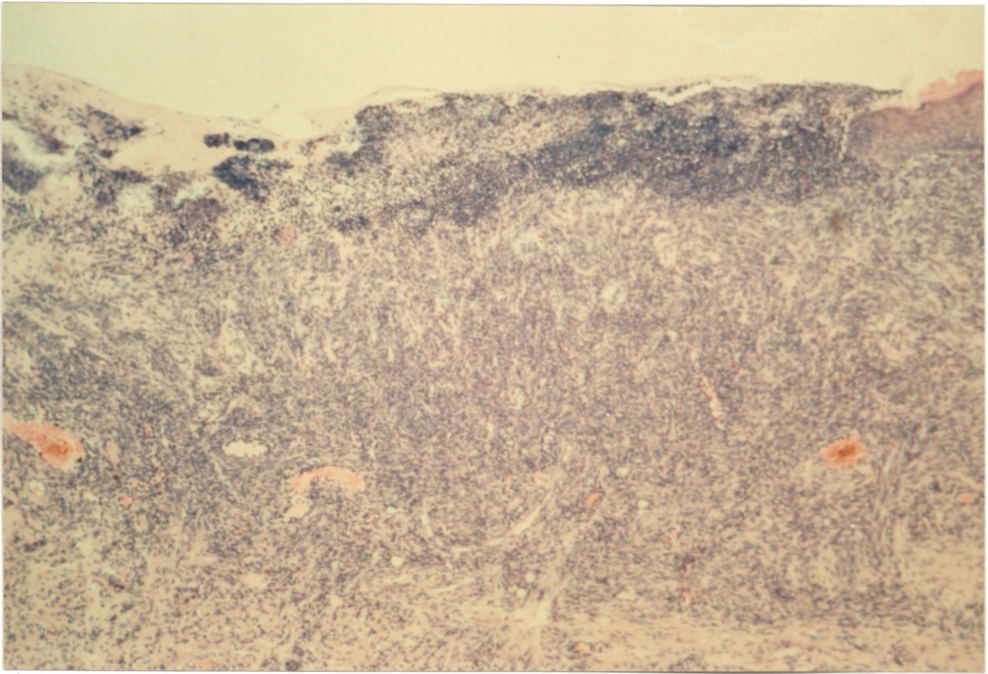
Szóstego dnia przepływ krwi zarówno w dzień jak i na brzegu wrzodu osiągnął najwyższe wartości, odpowiednio  $86 \pm 2,5$  i  $91 \pm 4,5$  ml/min/100 g. Brak było znamiennej statystycznie różnicy pomiędzy przepływem w dzień i na brzegu owrzodzenia.

W kolejnych dniach badań (dzień 8-my i 11-ty) przepływ stopniowo się obniżał w stosunku do wartości zarejestrowanych w 6-tym dniu. Spadek ten nie osiągnął jednak różnicy znamiennej statystycznie.

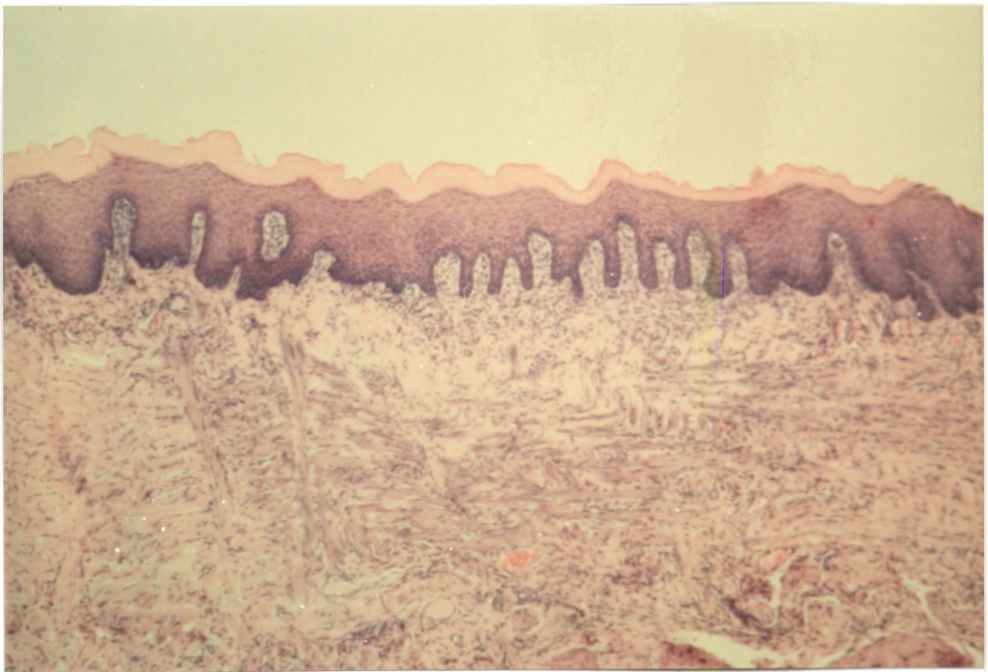
Wartości przepływu na brzegu owrzodzenia i w dzień wrzodu utrzymywały się od 4-go dnia po wywołaniu owrzodzenia na poziomie znamiennej wyższym, niż ten w nienaruszonej błonie śluzowej. Ten podwyższony przepływ krwi zanotowano także po pełnym wygojeniu w miejscu bliźni poowrzodzeniowej.

### 3. Histologiczne badanie śluzówki języka

Rycina 11 przedstawia obraz histologiczny przewlekłego owrzodzenia języka. Jak widać, nabłonek pokrywający język jest zupełnie zniszczony, a dno owrzodzenia pokryte martwiczymi masami. W głębszych warstwach widoczna jest tkanka ziarninowa z licznymi kapilarami, fibroblastami i naciekiem zapalnym.



Ryc. 11. Obraz histologiczny owrzodzenia języka w 4-tym dniu po jego wywołaniu (100-krotne powiększenie). Barwienie H + E. Dno owrzodzenia wysłane wysiękiem i masami martwiczymi. W głębi widoczna jest ziarnina.



Ryc. 12. Obraz histologiczny wygojonego owrzodzenia języka (100-krotne powiększenie). Barwienie H + E. Wygojone miejsce owrzodzenia pokryte jest nabłonkiem wielowarstwowym płaskim. W blaszce właściwej widoczna jest zmiana bliznowata.

Kolejne zdjęcie (ryc. 12) przedstawia obraz blizny po owrzodzeniu języka w 11-tym dniu po jego wywołaniu. Pokrywający bliznę po owrzodzeniu nabłonek wielowarstwowy płaski jest w pełni wykształcony, a w głębi, w blaszce właściwej widoczne są zmiany bliznowate.

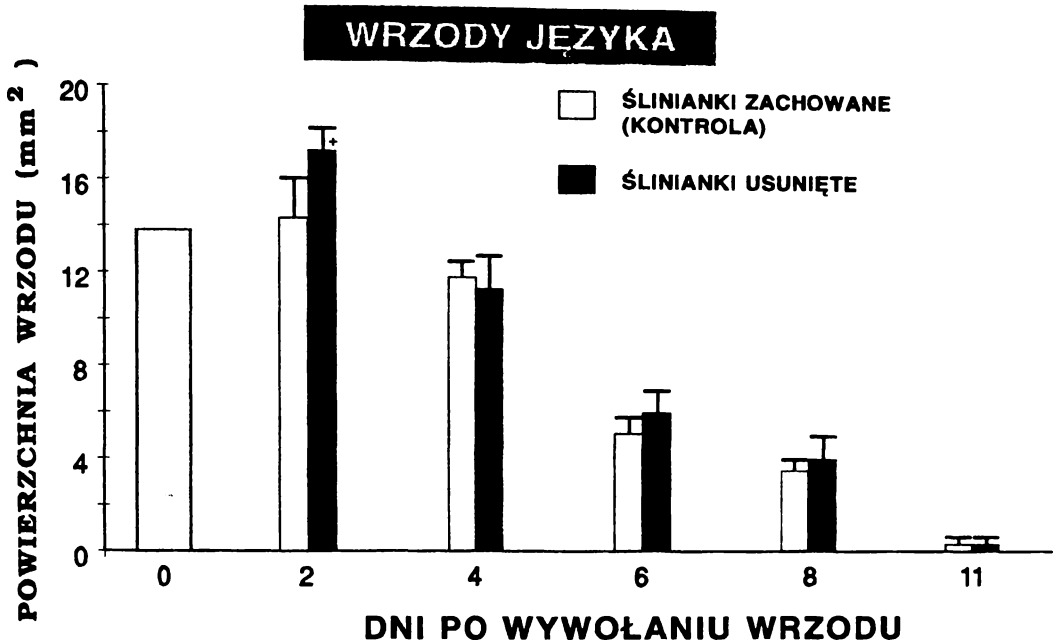
#### 4. Wpływ usunięcia ślinianek na szybkość gojenia się owrzodzenia języka

Na rycinie 13 przedstawiono zmiany wielkości powierzchni owrzodzeń w kolejnych dniach po ich wywołaniu w błonie śluzowej języka, u zwierząt z zachowanymi i usuniętymi śliniankami. Obserwacje prowadziłam w dniu rozpoczęcia doświadczenia (dzień „0”) i kolejno w 2-gim, 4-tym, 6-tym, 8-mym i 11-tym dniu po wywołaniu wrzodu.

Wszystkim zwierzętom grupy kontrolnej (rzekoma operacja) zarówno z zachowanymi, jak i usuniętymi śliniankami, wywołałam wrzody, których wyjściowa powierzchnia wynosiła  $13,8 \text{ mm}^2$ . W drugiej dobie u szczurów z zachowanymi śliniankami zaobserwowałam wzrost wielkości powierzchni wrzodu (o około 4%), zaś u zwierząt bezśliniankowych powierzchnia osiągnęła wartość  $17,2 \pm 1,0 \text{ mm}^2$ , co stanowiło wzrost o około 25%. Ten ostatni wzrost osiągał znamienność statystyczną w stosunku do wartości wyjściowych, ale nie był znamienny w przypadku szczurów z zachowanymi śliniankami.

U osobników z zachowanymi i usuniętymi śliniankami rozległość owrzodzenia stopniowo malała (w 4-tym dniu odpowiednio o 15% i 18%, w 6-tym dniu o 63% i 56%, a w 8-mym dniu o 75% i 70% w stosunku do wartości w dniu „0”).

W 11-tym dniu doświadczenia zarejestrowałam prawie zupełne wygojenie owrzodzeń, zarówno w jednej jak i w drugiej grupie zwierząt. Brak



Ryc. 13. Różnice w rozległości owrzodzeń języka u szczurów z zachowanymi (kontrola) i usuniętymi śliniankami w kolejnych dniach badania („0” – 11 dzień). Krzyżykiem oznaczono statystycznie znamienne ( $P < 0,05$ ) wzrost powierzchni owrzodzenia w stosunku do wartości kontrolnej.

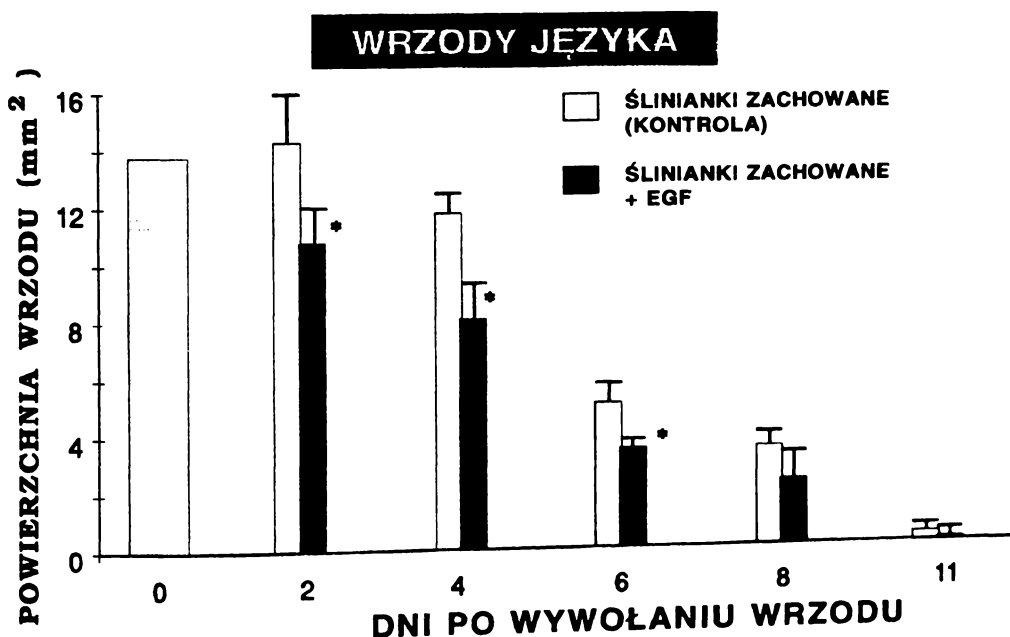
było znamiennej statystycznie różnic w rozległości owrzodzeń pomiędzy grupą szczurów z zachowanymi i usuniętymi śliniankami.

##### 5. Wpływ EGF na szybkość gojenia owrzodzeń języka u zwierząt z zachowanymi śliniankami i po usunięciu ślinianek

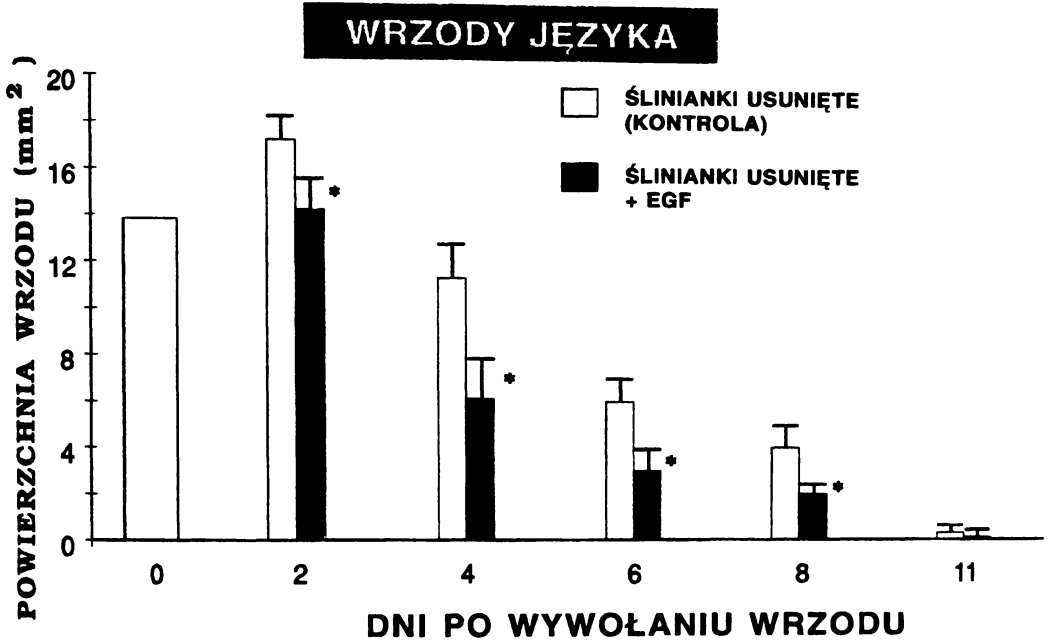
Rycina 14 przedstawia wpływ doustnego podawania EGF (dzienna dawka – 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) na wielkość powierzchni uszkodzenia w grupie zwierząt z zachowanymi śliniankami.

W ciągu 11-dniowej obserwacji powierzchnia owrzodzeń ulegała stopniowej redukcji w stosunku do wartości wyjściowej w dniu „0”. Podawanie EGF spowodowało znamienne statystycznie zmniejszenie powierzchni uszkodzeń (w stosunku do grupy kontrolnej, której nie podawano EGF) w dniu 2-gim, 4-tym i 6-tym od dnia indukcji tych uszkodzeń. W dniach 8-mym i 11-tym, gdy zasięg powierzchni owrzodzeń przyjmował najniższe wartości, brak było znamienych statystycznie różnic w wielkości powierzchni wrzodów. W 11-tym dniu badania zaobserwowałam niemal całkowite wygojenie w grupie zwierząt zarówno z zachowanymi, jak również usuniętymi śliniankami.

Rycina 15 obrazuje wpływ doustnego podawania EGF (dawka dzienna – 100 µg/kg) na zmiany wielkości powierzchni uszkodzenia w gru-



Ryc. 14. Wpływ doustnego podawania EGF na zasięg owrzodzeń u szczurów z zachowanymi śliniankami. Gwiazdki oznaczają statystycznie znamiennej (P<0,05) różnicę między zwierzętami kontrolnymi, a tymi którym podawano EGF.



Ryc. 15. Wpływ doustnego podawania EGF na zasięg owrzodzeń u szczurów z usuniętymi śliniankami. Gwiazdki oznaczają statystycznie znamienne ( $P < 0,05$ ) różnice między zwierzętami kontrolnymi a tymi, którym nie podawano EGF.

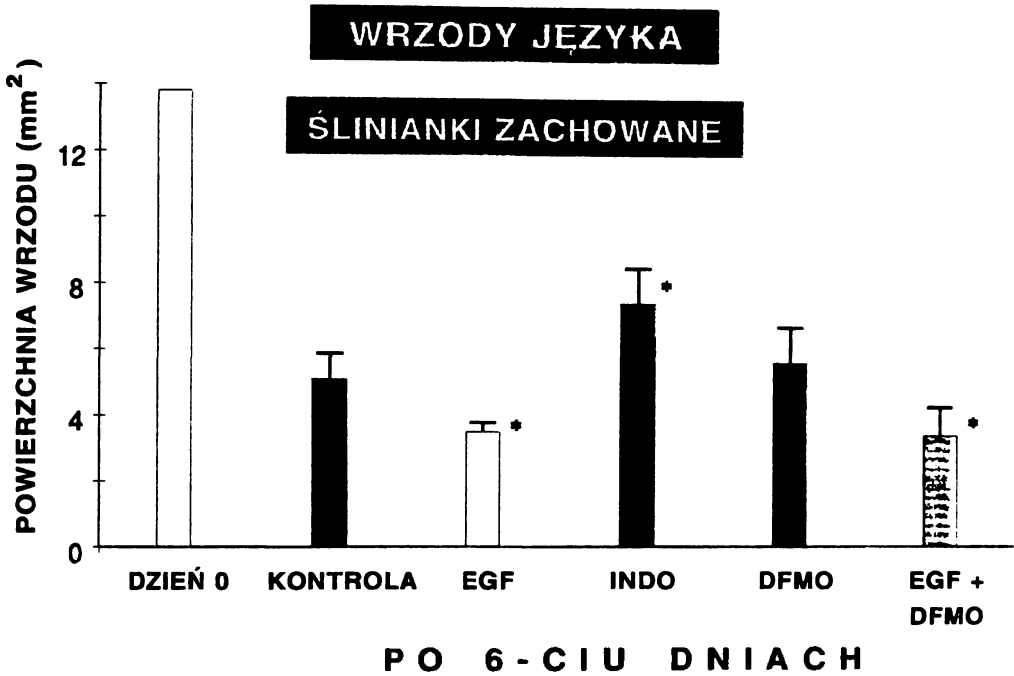
pie zwierząt z usuniętymi gruczołami ślinowymi. U zwierząt otrzymujących EGF obserwowałam poczynając od 2-giego dnia doświadczenia, znamienne statystycznie spadek wielkości powierzchni uszkodzeń w stosunku do wartości kontrolnej. Różnica ta zanikała w 11-tym dniu, gdy powierzchnia owrzodzeń osiągała najniższe wartości i gdy następowało niemal całkowite ich wygojenie u szczurów bezśliniankowych (zarówno tych otrzymujących, jak i nie otrzymujących EGF).

## 6. Wpływ DFMO i indometacyny na gojenie się owrzodzeń języka u zwierząt z zachowanymi lub usuniętymi gruczołami ślinowymi

Gojenie się owrzodzeń na błonie śluzowej języka u szczurów z zachowanymi śliniankami i u zwierząt po usunięciu ślinianek, otrzymujących indometacynę (2 mg/kg dootrzewnowo) lub DFMO (w jednorazowej dootrzewnowej iniekcji w ilości 200 mg/kg/dzień) przedstawiają ryciny 16 i 17.

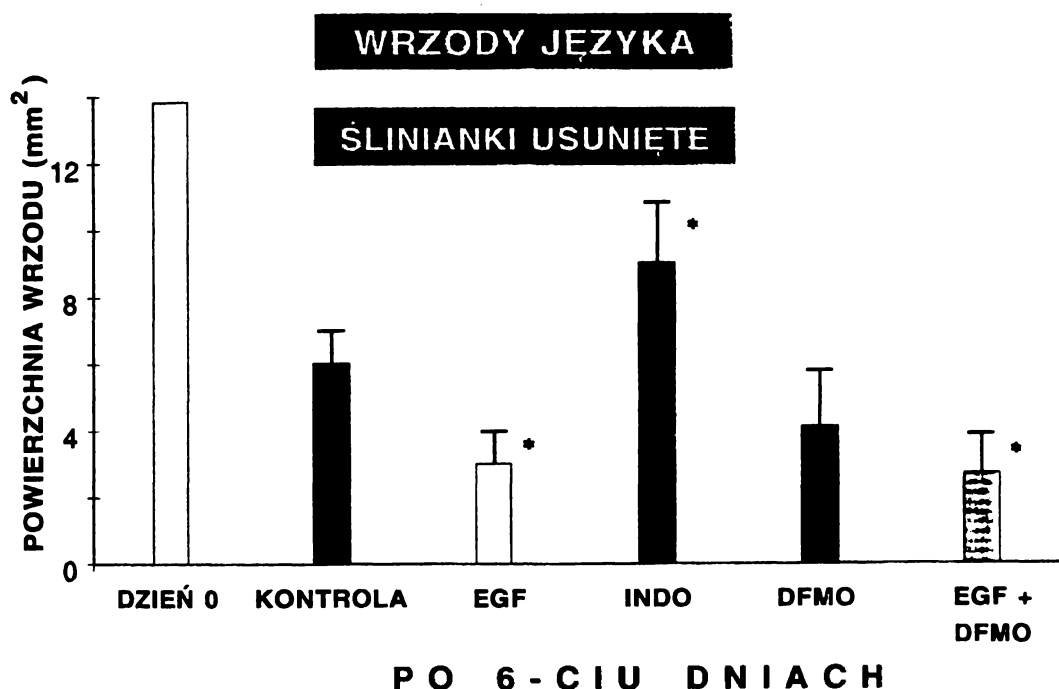
Indometacyna znacznie opóźniała gojenie owrzodzeń, zarówno u szczurów z zachowanymi, jak i usuniętymi gruczołami ślinowymi, zwiększając zasięg uszkodzenia w 6-tym dniu od jego wywołania (odpowiednio z wartości 13,8 mm<sup>2</sup> do 7,4 ± 1,1 mm<sup>2</sup> i 9,0 ± 1,8 mm<sup>2</sup>, co oznacza statystycznie znamiennego wzrost odpowiednio o 45,1% i 50% w stosunku do kontroli).

W grupie zwierząt z zachowanymi gruczołami ślinowymi, podanie DFMO powodowało nieznamiennego statystycznie wzrost powierzchni owrzodzeń do 5,6 ± 1,1 mm<sup>2</sup>, a więc o około 10% w stosunku do powierzchni owrzodzeń w grupie kontrolnej. Stosowanie DFMO nie ograniczało efektów podawanego doustnie EGF. W grupie szczurów bezśliniankowych podanie DFMO powodowało redukcję powierzchni owrzodzeń do 4,2 ± 1,7 mm<sup>2</sup>, czyli o 31,7% w stosunku do grupy kontrolnej. Spadek ten nie osiągał jednak znamienności statystycznej. Podanie DFMO nie miało również w tej grupie zwierząt istotnego statystycznie wpływu na efekty działania EGF.



Ryc. 16. Owrzodzenia języka u szczurów z zachowanymi śliniankami 6 dni po wywołaniu uszkodzeń. Wpływ doustnego podawania EGF, dootrzewnowej iniekcji indometacyny lub DFMO oraz równoczesnego stosowania EGF i DFMO. Gwiazdki oznaczają statystycznie znamienne ( $P < 0,05$ ) różnicę między efektami jakie uzyskano u zwierząt, które otrzymywały odpowiednie preparaty i u tych, którym nie podawano tych preparatów.





Ryc. 17. Owrzodzenia języka u szczurów z usuniętymi śliniankami po upływie 6-ciu dni od wywołania uszkodzeń – wpływ doustnego podawania EGF, dootrzewnowej iniekcji indometacyny lub DFMO oraz równoczesnego stosowania EGF i DFMO. Gwiazdki oznaczają statystycznie znamiennej ( $P < 0,05$ ) różnicę między efektami jakie uzyskano u zwierząt, które otrzymywały odpowiednie preparaty i u tych, którym nie podawano tych preparatów.

## 7. Gojenie wrzodów żołądka o różnej powierzchni

Rycina 18 przedstawia obraz makroskopowy przewlekłego wrzodu żołądka o powierzchni wyjściowej 28 mm<sup>2</sup> (w dniu „0”).

Na rycinie 19 zobrazowano dynamikę gojenia wrzodów żołądka o różnej powierzchni wyjściowej (7,7 mm<sup>2</sup>, 13,8 mm<sup>2</sup>, 28 mm<sup>2</sup>). Obserwacje prowadziłam w drugim, siódmym, czternastym i dwudziestym pierwszym dniu po wywołaniu uszkodzeń.

Wrzody, których wyjściowa powierzchnia wynosiła około 7,7 mm<sup>2</sup>, ulegały w 14-tym dniu samoistnemu wygojeniu, przy czym w dniu 7-mym

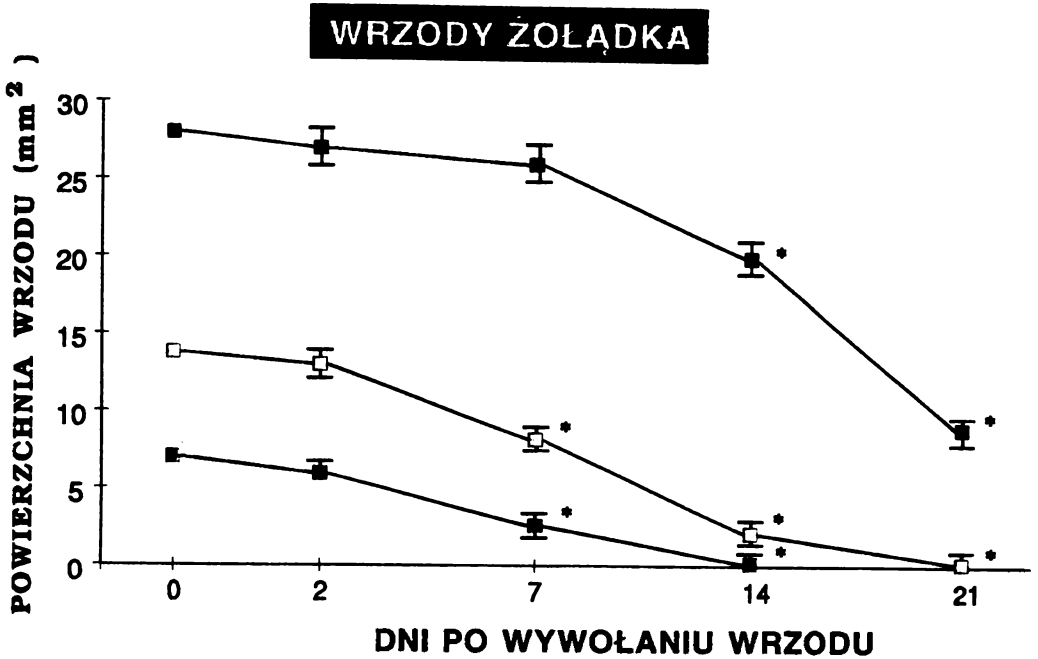


Ryc. 18. Obraz makroskopowy przewlekłego wrzodu żołądka.

średnia powierzchnia uszkodzeń znamienne obniżała się do  $2,6 \pm 0,6 \text{ mm}^2$  (była zredukowana więc o około 62,9%).

Gdy wyjściowa powierzchnia owrzodzenia wynosiła  $28 \text{ mm}^2$ , to w 7-mym dniu malała ona zaledwie o około 7,2%, ale już w 14-tej dobie o 28,6%, co stanowiło statystycznie znamienne różnicę między powierzchnią uszkodzenia w danym dniu, a jej wartością w dniu „0”. W ostatnim, 21-szym dniu doświadczenia powierzchnia owrzodzeń zmalała do  $9,0 \pm 0,6 \text{ mm}^2$ . Stanowiło to obniżenie o 67,9% w stosunku do wartości wyjściowej. Różnica ta jest również statystycznie znamienne.

Wrzody, których powierzchnia wyjściowa wynosiła  $13,8 \text{ mm}^2$  ulegały całkowitemu wygojeniu po 21 dniach. Znamienne statystycznie zmniejszenie powierzchni zaznaczyło się w 7-mym dniu eksperymentu i wynosiło



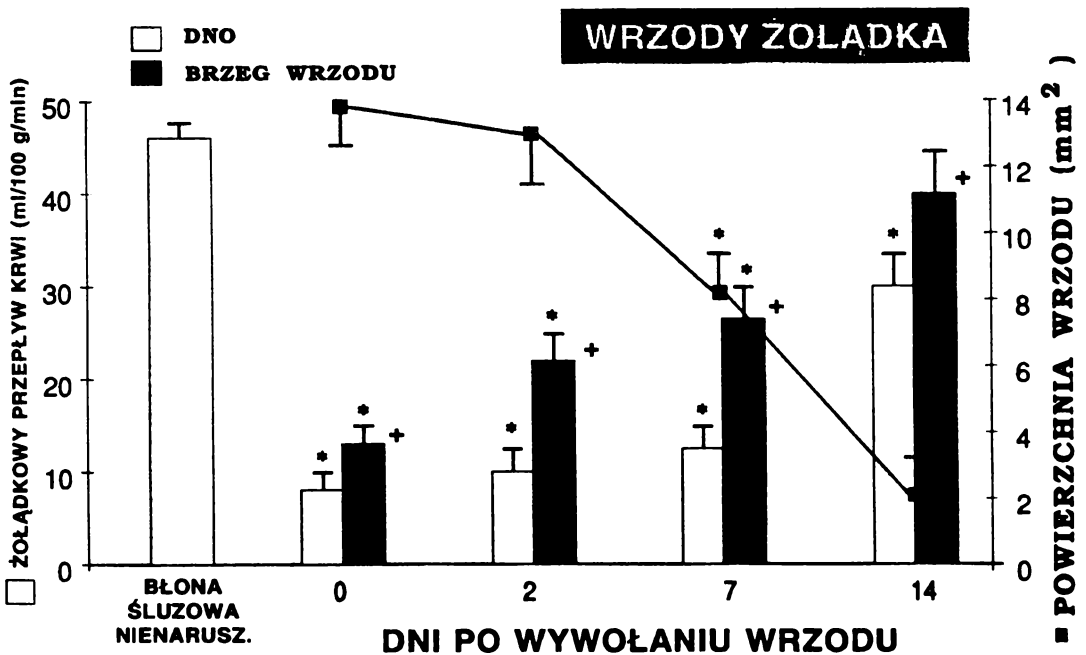
Ryc. 19. Dynamika gojenia wrzodów żołądka o różnej powierzchni wyjściowej. Gwiazdki oznaczają statystycznie znaczącą ( $P < 0,05$ ) różnicę między powierzchnią wyjściową w dniu „0” a powierzchnią w 7-mym, 14-tym i 21-szym dniu badań.

około 40,6%. W 14-tym dniu zanotowałam zmniejszenie powierzchni wrzodu o 94,8% (powierzchnia wynosiła  $2,1 \pm 0,4 \text{ mm}^2$ ).

## 8. Badanie przepływu krwi w mikrokrążeniu błony śluzowej żołądka

Rycina 20 przedstawia relację pomiędzy powierzchnią wrzodu żołądka a przepływem krwi w dnie i na brzegu owrzodzenia w kolejnych dniach badania. Przepływ krwi w zdrowej, nie uszkodzonej błonie śluzowej

żołądka wynosił  $46,0 \pm 3,5$  ml/min/100 g. Przepływ mierzony bezpośrednio po wywołaniu uszkodzenia (dzień „0”) był znacznie niższy niż ten w nie uszkodzonej błonie śluzowej. W dniu wrzodu przepływ osiągnął wartość  $8,0 \pm 2,0$  ml/min/100 g, a na brzegu owrzodzenia wynosił on  $13,0 \pm 2$  ml/min/100 g. Przepływ krwi był więc odpowiednio o 82,6% i 71,7% mniejszy w porównaniu z przepływem kontrolnym.



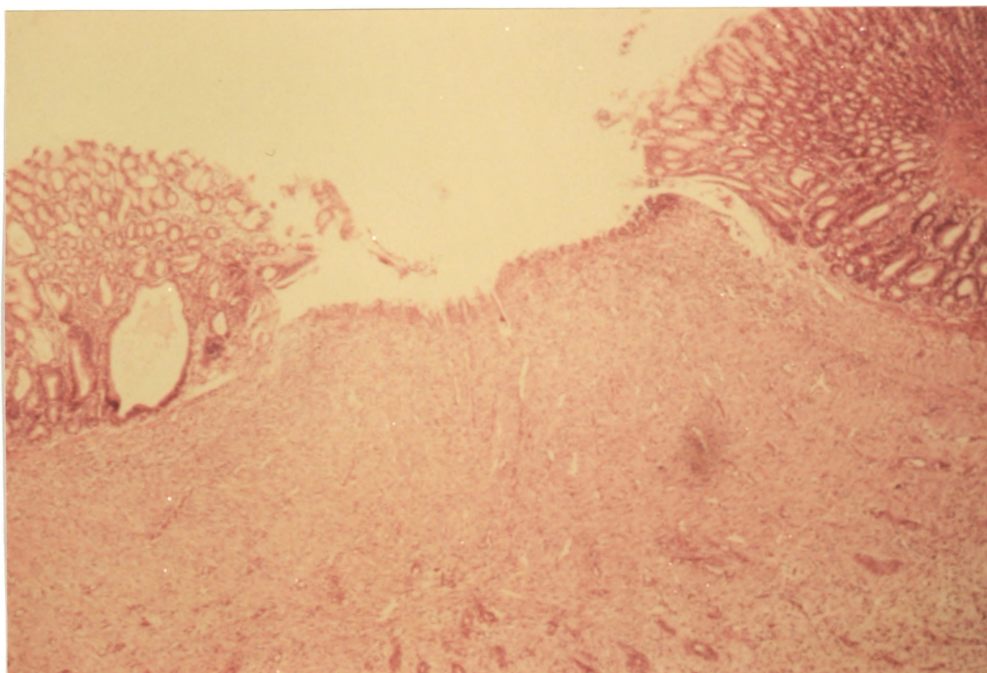
Ryc. 20. Przepływ krwi (w postaci słupków) w nienaruszonej błonie śluzowej żołądka oraz w dniu i na brzegu wrzodu a także powierzchni wrzodu (w postaci linii ciągłej) w kolejnych dniach badania. Gwiazdki oznaczają statystycznie znaczącą ( $P < 0,05$ ) różnicę między przepływem w nienaruszonej błonie śluzowej a przepływem w różnych dniach badania. Informują także o statystycznie istotnym zmniejszeniu powierzchni wrzodów w stosunku do wartości wyjściowej. Krzyżyki pokazują wzrost przepływu krwi na brzegu owrzodzenia w stosunku do przepływu w dniu wrzodu.

W 2-gim dniu po zabiegu przepływ wykazywał nieco wyższe wartości, szczególnie na brzegu owrzodzenia, gdzie osiągał wartość  $22,0 \pm 3$  ml/min/100 g. W 7-mym dniu zarejestrowałam również niewielki wzrost przepływu krwi, zarówno w dniu owrzodzenia jak i na jego brzegu (odpowiednio  $12,5 \pm 2$  ml/min/100 g i  $26,5 \pm 3,5$  ml/min/100 g). W 14-tym dniu przepływ na brzegu owrzodzenia wzrósł do wartości  $40,0 \pm 4,5$  ml/min/100 g i nie różnił się znamienne od wartości przepływu w nie uszkodzonej błonie śluzowej. Tymczasem w dniu wrzodu przepływ krwi wynosił  $30,0 \pm 3,5$  ml/min/100 g i był nadal znamienne niższy (spadek o 34,8%) od przepływu w nie uszkodzonej błonie śluzowej.

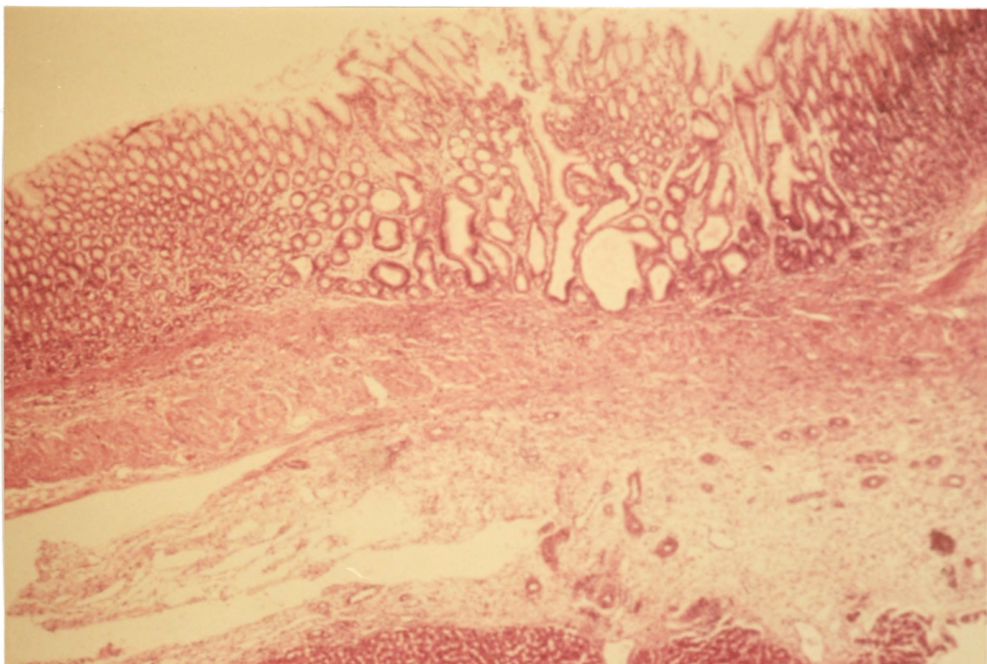
## 9. Histopatologiczne badania śluzówki żołądka

Ryc. 21A ukazuje obraz histologiczny wykształconego wrzodu żołądka w okresie gojenia. Widoczny ubytek błony śluzowej wypełnia tkanka ziarninowa z licznymi naczyniami krwionośnymi i naciekiem zapalnym. Błona śluzowa na brzegu owrzodzenia wykazuje ubytki śluzówki oraz cystowate poszerzenia gruczołów żołądkowych.

Kolejna rycina (21B) przedstawia obraz histologiczny w okresie stwierdzanego makroskopowo wygojenia. Błona śluzowa pokrywająca bliznę wykazuje obecność cystowato poszerzonych gruczołów żołądkowych ze słabo zróżnicowanymi komórkami i zmniejszoną siecią naczyń kapilarnych.



**A**



**B**

**Ryc. 21.** Obraz histologiczny wrzodu żołądka w okresie gojenia (A) i blizna po makroskopowo wygojonym wrzodzie żołądka (B)

## 10. Wpływ usunięcia ślinianek na szybkość gojenia się wrzodów żołądka

Procentowe zmiany szybkości gojenia wrzodów żołądkowych u szczurów z zachowanymi gruczołami ślinowymi, którym przez 7 dni podawano sól fizjologiczną (kontrola) lub doustnie EGF (dzienna dawka 100 µg/kg) przedstawia rycina 22. U szczurów z zachowanymi śliniankami, stan wygojenia w 7-mej dobie, wynosił  $41 \pm 1\%$ . W równolegle obserwowanej grupie zwierząt z zachowanymi śliniankami, traktowanej EGF, obserwowaliśmy znacznie szybszy proces gojenia ( $92 \pm 0,5\%$ ).



Ryc. 22. Szybkość gojenia wrzodów żołądka u szczurów z zachowanymi i usuniętymi śliniankami po 7-miu dniach stosowania EGF lub soli fizjologicznej (vehiculum). Gwiazdki oznaczają statystycznie znaczne ( $P < 0,05$ ) przyspieszenie gojenia w stosunku do gojenia wrzodu w grupie kontrolnej, otrzymującej sól fizjologiczną. Krzyżyk określa znamienne statystycznie spadek szybkości gojenia w porównaniu do grupy kontrolnej z zachowanymi śliniankami otrzymującej vehiculum.

U zwierząt z usuniętymi gruczołami ślinowymi szybkość gojenia wrzodów była niższa, niż u tych z zachowanymi gruczołami. Podawanie doustne EGF znamienne statystycznie przyspieszało gojenie uszkodzeń w grupie zwierząt bezśliniankowych (szybkość gojenia osiągnęła wartość  $75 \pm 0,8\%$ ). Brak było znamiennych statystycznie różnic w szybkości gojenia wrzodów pod wpływem EGF pomiędzy szczurami z zachowanymi a usuniętymi śliniankami.

## 11. Wpływ EGF na szybkość gojenia wrzodów żołądka

Wpływ stosowania EGF w dawce dziennej  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  na wielkość uszkodzeń żołądkowych po 7-miu i po 14-tu dniach leczenia przedstawia rycina 23. Wyjściowa powierzchnia wrzodów w dniu „0” wynosiła  $13,8 \text{ mm}^2$ .

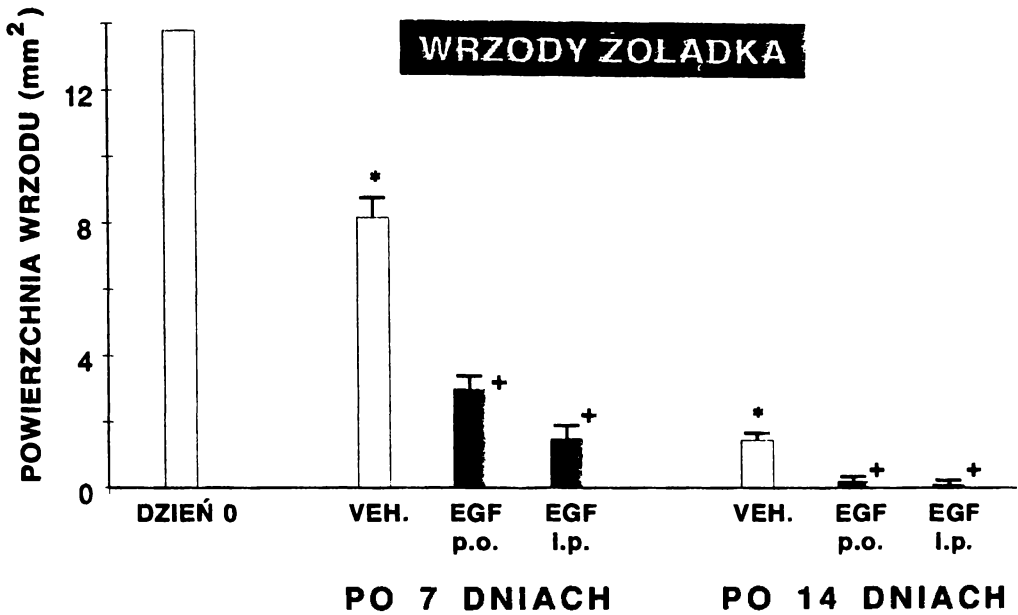
Po 7-miu dniach, w grupie zwierząt otrzymujących jedynie sól fizjologiczną (vehiculum), powierzchnia wrzodów malała do  $8,2 \pm 0,6 \text{ mm}^2$ . Powierzchnia wrzodu zmniejszyła się zatem o  $40,6\%$  w stosunku do wartości wyjściowej. W grupie szczurów leczonych podawanym doustnie EGF, powierzchnia ta wynosiła  $3,0 \pm 0,4 \text{ mm}^2$ , co stanowiło zmniejszenie o  $78,3\%$ .

U zwierząt, którym podawano EGF dootrzewnowo, zaobserwowałam zmniejszenie powierzchni wrzodu do  $1,5 \pm 0,4 \text{ mm}^2$ , a więc o około  $89\%$  (w stosunku do grupy kontrolnej bez EGF).

W 14-tym dniu badania powierzchnia wrzodu, w grupie zwierząt otrzymujących tylko sól fizjologiczną ulegała dalszemu statystycznie znamiennemu zmniejszeniu o  $84,8\%$  (w stosunku do powierzchni wyjściowej w dniu „0”) i o około  $70\%$  (w stosunku do kontroli po 7-miu dniach).

Po 14-tu dniach powierzchnia wrzodów, w grupie zwierząt otrzymujących doustnie EGF, wynosiła  $0,2 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ . Zmalała więc o  $98,6\%$  w stosunku do powierzchni wyjściowej. U szczurów, którym podawano w tym





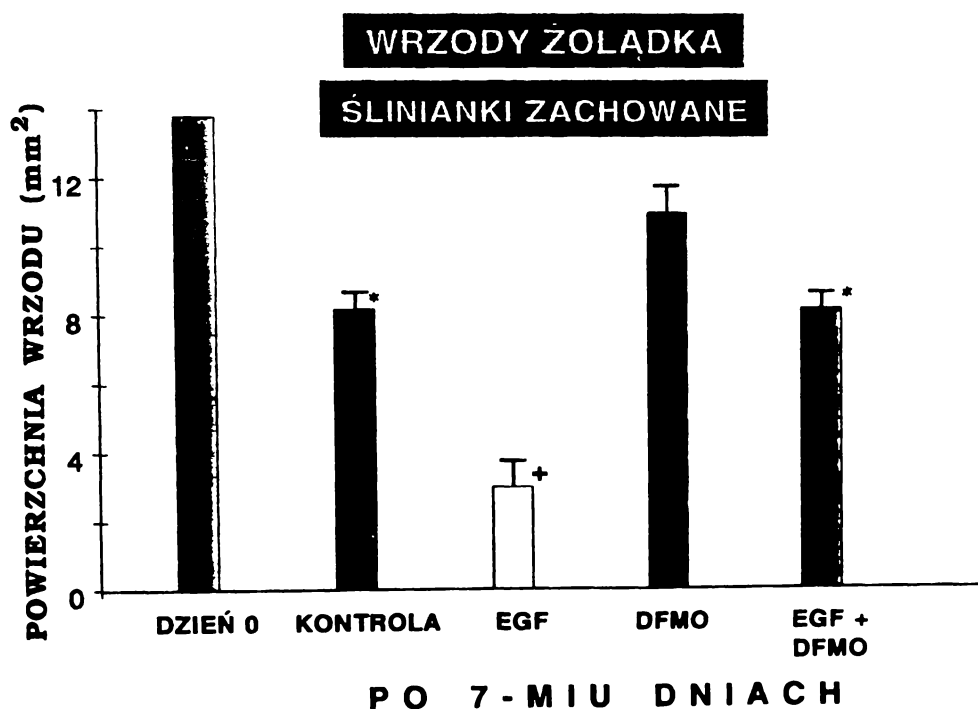
Ryc. 23. Efekty doustnego (p.o.) i dootrzewnowego (i.p.) podawania EGF przez 7 i 14 dni na zmiany powierzchni wrzodu. Gwiazdki oznaczają znamienne statystycznie ( $P < 0,05$ ) zmniejszenie powierzchni wrzodu w stosunku do jej wartości wyjściowej. Krzyżyki pokazują znamienne statystycznie ( $P < 0,05$ ) zmniejszenie powierzchni wrzodu w grupie zwierząt otrzymujących sól fizjologiczną (vehiculum).

czasie EGF drogą dootrzewnową, również obserwowałam znamienne statystycznie spadek wielkości powierzchni uszkodzeń do  $0,1 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ . Odpowiada to około 99,3% wygojenia.

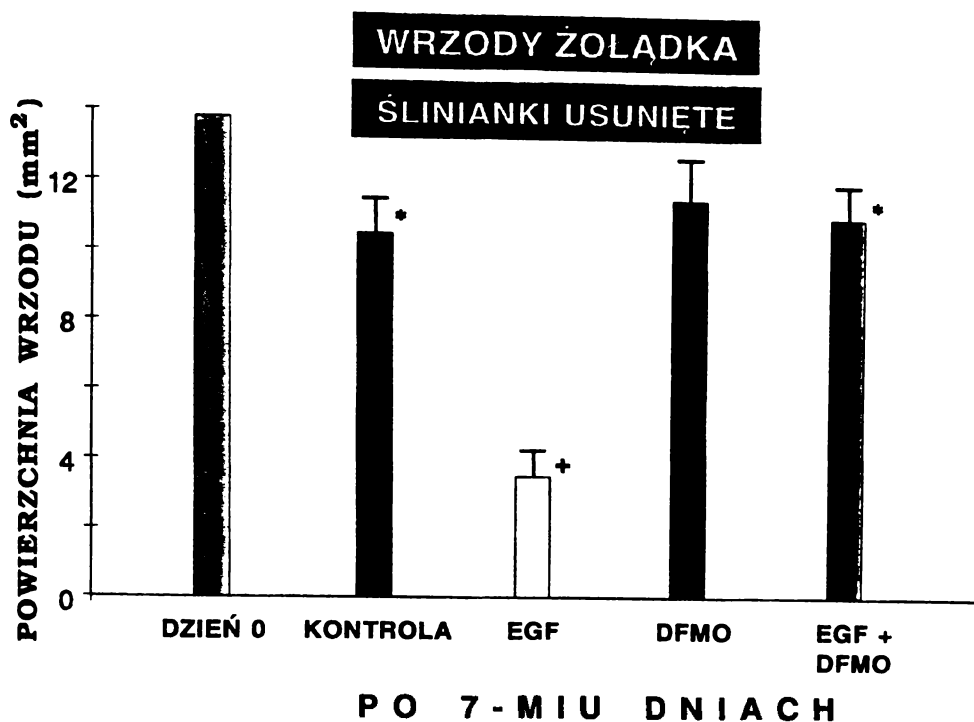
## 12. Wpływ DFMO na gojenie wrzodów żołądka u szczurów z zachowanymi i usuniętymi śliniankami

Gojenie wrzodów żołądka u szczurów otrzymujących dootrzewowo DFMO (dzienna dawka 200 mg/kg), doustnie EGF (100  $\mu$ g/kg-dzień) lub równoczesnego stosowania tych preparatów obrazuje rycina 24 i 25.

W grupie zwierząt z zachowanymi śliniankami, podanie DFMO opóźniało gojenie w stosunku do kontroli z solą fizjologiczną. EGF wywołał wyraźne przyspieszenie gojenia (po 7-miu dniach wyniosło ono ponad 60% w stosunku do wartości kontrolnej). Równoczesne stosowanie DFMO



Ryc. 24. Wpływ stosowania EGF, DFMO osobno oraz równoczesnego podawania EGF i DFMO u szczurów z zachowanymi śliniankami. Gwiazdki oznaczają statystycznie znamienne ( $P < 0,05$ ) zmniejszenie powierzchni w stosunku do grupy z wrzodem w dniu „0”. Krzyżyk obrazuje znamienne statystycznie ( $P < 0,05$ ) zmniejszenie powierzchni wrzodów w stosunku do grupy kontrolnej i do grupy przyjmującej kombinację EGF plus DFMO.



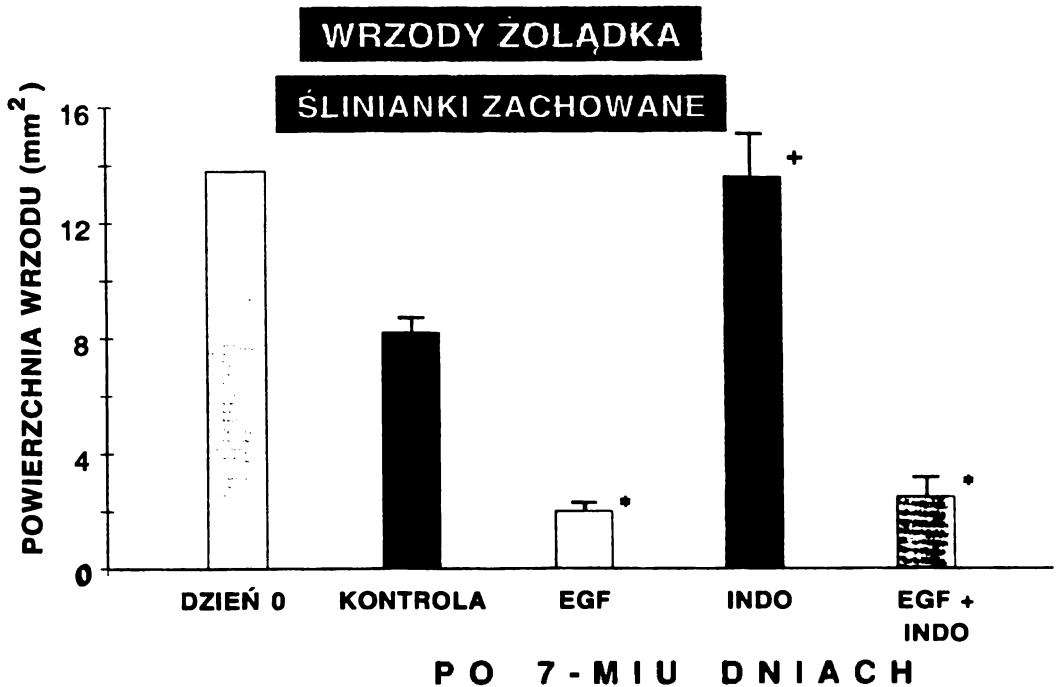
Ryc. 25. Wpływ stosowania EGF, DFMO osobno oraz kombinacji EGF i DFMO u szczurów z usuniętymi gruczołami ślinowymi. Gwiazdki oznaczają statystycznie znamienne ( $P < 0,05$ ) zmniejszenie powierzchni w stosunku do grupy z wrzodem w dniu „0”. Krzyżyk obrazuje znamienne statystycznie ( $P < 0,05$ ) zmniejszenie powierzchni wrzodów w stosunku do grupy kontrolnej i do grupy przyjmującej kombinację EGF plus DFMO.

i EGF hamowało powierzchnię wrzodów w stosunku do grupy z EGF również o około 60%. Wielkość powierzchni wrzodu w tej grupie osiągnęła podobne wartości jak grupa kontrolna i nie stwierdziłam różnicy znamiennej statystycznie pomiędzy tymi grupami.

### 13. Wpływ indometacyny na gojenie wrzodów żołądka u szczurów z zachowanymi i usuniętymi śliniankami

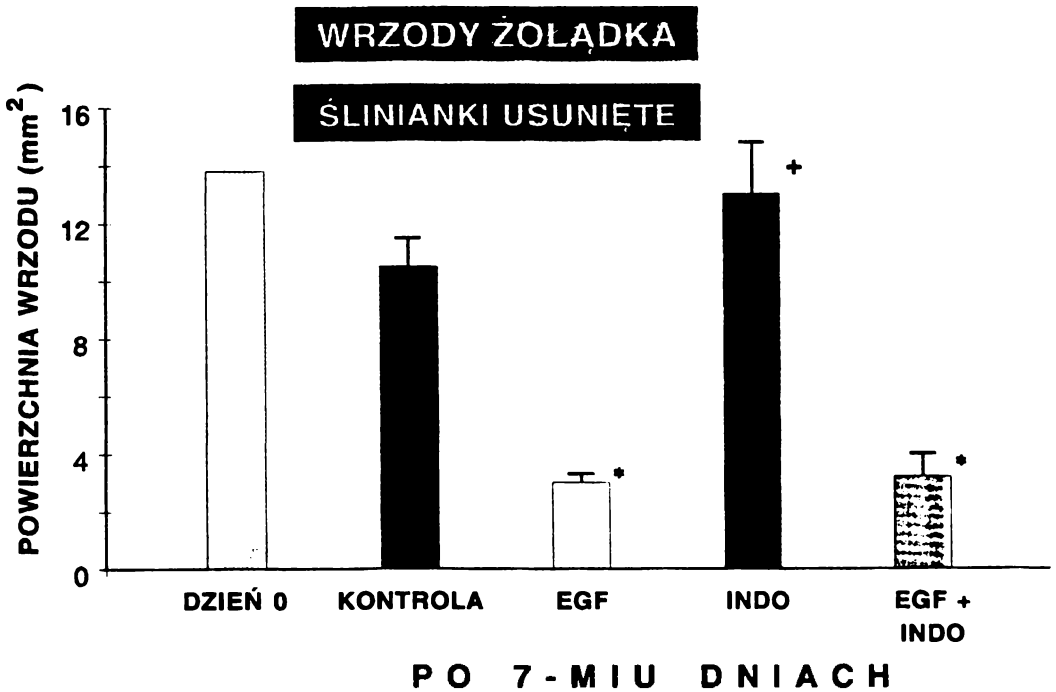
Dzienne podawanie indometacyny dootrzewnowo w dawce 2 mg/kg przez okres 7-miu dni, prowadziło do znamiennego statystycznie wzrostu powierzchni wrzodów żołądka w porównaniu ze zmianami tej powierzchni u szczurów kontrolnych, nie otrzymujących indometacyny.

Doustne stosowanie EGF znamienne przyspieszało gojenie tych wrzodów, zmniejszając powierzchnię o około 75% – u szczurów z zachowanymi śliniankami lub o około 72% – u szczurów z usuniętymi gruczołami ślino-



Ryc. 26. Wpływ stosowania EGF, indometacyny osobno oraz równoczesnego podawania EGF i indometacyny na zmiany powierzchni wrzodu u szczurów z zachowanymi śliniankami. Gwiazdki oznaczają znamienne statystycznie ( $P < 0,05$ ) spadek, a krzyżyk znamienne statystycznie ( $P < 0,05$ ) wzrost powierzchni wrzodów w stosunku do zmian tej wartości w grupie kontrolnej.

wymi (Ryc. 26 i 27). W grupie zwierząt, którym podawano EGF w kombinacji z indometacyną, powierzchnia wrzodów była zbliżona do tej, jaką zanotowałam w grupie zwierząt otrzymujących tylko EGF i powierzchnia wrzodu w obydwóch grupach nie różniła się znamienne.



Ryc. 27. Wpływ stosowania EGF, indometacyny osobno oraz kombinacji EGF i indometacyny na zmiany powierzchni wrzodu u szczurów z usuniętymi śliniankami. Gwiazdki oznaczają znamienne statystycznie ( $P < 0,05$ ) spadek, a krzyżyk znamienne statystycznie ( $P < 0,05$ ) wzrost powierzchni wrzodów w stosunku do zmian powierzchni w grupie kontrolnej.

# DYSKUSJA

Uszkodzenia błony śluzowej przewodu pokarmowego o charakterze przewlekłych owrzodzeń posiadają wiele wspólnych cech z przewlekłymi ranami powłok skórnych. W obu przypadkach brak jest ciągłości nabłonka powierzchni, a w dnie ubytku rozwija się tkanka ziarninowa, złożona głównie z nowo powstających naczyń kapilarnych (angiogeneza) oraz licznych komórek zapalnych i fibroblastów (prolifерacja). W procesie ich gojenia wyróżnia się te same klasyczne etapy: naprawczo-zapalny, proliferacyjny i przebudowy tkanki [76]. Badania Laato i współpracowników [77, 78] wykazały, że EGF dawkozależnie stymuluje tworzenie tkanki ziarninowej i proliferację komórek oraz zwiększa przepływ krwi w doświadczalnej tkance ziarninowej. W innych badaniach dowiedziono, że EGF pobudza również produkcję i odkładanie kolagenu w doświadczalnej ziarninie [79].

Z powyższych badań wynika, że w procesie gojenia wrzodów i ran istotne znaczenie posiada tworzenie nowych kapilarów i proliferacja zarówno fibroblastów, jak i komórek nabłonkowych. EGF pobudza powyższe zmiany (prolifерację i angiogenezę), przyspieszając w ten sposób proces gojenia.

Celem moich badań było określenie wpływu EGF – podawanego egzogennie i uwalnianego endogennie – na dynamikę gojenia doświadczalnie wywołanych owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej oraz żołądka. Te dwa

obszary wywoływania wrzodów dobrałam celowo, aby zbadać proces gojenia w warunkach bez udziału kwasu solnego i pepsyny (jama ustna) oraz z udziałem tych czynników (żołądek). Wrzody na języku i w żołądku wywoływałam przy użyciu zmodyfikowanej [14] metody Okabe i współpracowników [74], stosując lokalnie 100% kwas octowy. Aplikacja kwasu w tych obszarach powodowała natychmiastową nekrozę błony śluzowej i podśluzowej [14], prowadząc do rozwoju przewlekłego owrzodzenia. Dotychczas metoda z użyciem kwasu octowego była stosowana tylko do wywoływania doświadczalnych wrzodów żołądka [14, 28, 74] lub dwunastnicy [28]. W obecnej pracy po raz pierwszy zastosowałam tę technikę do wywoływania owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej. W tym celu wybrałam łatwo dostępną do obserwacji pokrywającą język błonę śluzową. W ludzkiej błonie śluzowej języka mogą rozwijać się uszkodzenia w wyniku działania różnych czynników. Profilaktyka i leczenie tych uszkodzeń, zgodnie z doniesieniami, które przedstawiłam we wstępie, stanowią poważny problem terapeutyczny. Z nielicznych prac z tego zakresu wynika, że brak jest skutecznych leków, które przyspieszałyby gojenie przewlekłych, trudno gojących się uszkodzeń jamy ustnej. Ferraro i inni [80, 81] oraz Solomon [82] wykazali, że sukralfat zaliczany do klasycznych leków przeciwwrzdowych, przyspiesza gojenie owrzodzeń jamy ustnej powstających w wyniku powikłań po chemioterapii. Wyniki tych badań nie znalazły jednak w pełni potwierdzenia w pracy Shenepa [83]. Dowiódł on, że sukralfat odznacza się silnymi właściwościami adhezyjnymi do błony śluzowej jamy ustnej i redukuje rozwój lokalnej infekcji bakteryjnej. Lek ten nie zapobiega jednak owrzodzeniom zapalnym jamy ustnej (tzw. mucositis), powstałym w następstwie chemioterapii nowotworowej u dzieci [83].

Biorąc pod uwagę istotne znaczenie proliferacji komórkowej i angiogenezy w gojeniu oraz kluczową rolę EGF dla tych procesów, zbadalam dynamikę gojenia owrzodzeń błony śluzowej języka i żołądka w warunkach

niedoboru endogennego EGF wskutek usunięcia ślinianek, a także po uzupełnieniu deficytu EGF, poprzez podawanie tego peptydu do wypijanej przez zwierzęta wody. Ponadto przy użyciu laserowego przepływomierza określałam zmiany przepływu krwi w dniu, na brzegu wrzodu i w zdrowej tkance celem oceny udziału czynnika krążeniowego w procesie gojenia.

Analiza wyników moich badań dowodzi, że EGF ma silnie przyspieszający wpływ na proces gojenia przewlekłych wrzodów wywołanych na błonie śluzowej języka i żołądka. Gojenie ulega wyraźnemu opóźnieniu u zwierząt z usuniętymi śliniankami, co stanowi dowód na to, że endogenny EGF odgrywa kluczową rolę w naturalnym procesie odnowy uszkodzonej błony śluzowej języka i żołądka. Podawanie EGF zwierzętom bezśliniankowym, a więc pozbawionym głównego endogennego źródła tego czynnika, przyspieszało proces gojenia, potwierdzając szczególne znaczenie EGF w prawidłowym przebiegu gojenia uszkodzeń błony śluzowej. Ponadto wykazałam, że dynamika procesu gojenia jest ściśle związana ze wzrostem lokalnego przepływu krwi w obszarze wrzodu.

Odkrycie EGF w 1962 roku przez Cohena [18, 19] w mysich gruczołach ślinowych i wyizolowanie tego peptydu przez Gregorego i współpracowników [20, 21, 22] stanowiło istotny postęp w późniejszych badaniach nad czynnikami i mechanizmami biorącymi udział w gojeniu się różnego pochodzenia ran i ubytków błony śluzowej. Dalsze badania nad lokalizacją EGF wykazały, że peptyd ten jest obecny głównie w śliniankach podżuchwowych, a także w gruczołach dwunastniczych Brunnera [23, 24, 25]. Występuje on także w niewielkim stężeniu w osoczu krwi w postaci wolnej oraz związanej z elementami morfotycznymi, głównie z płytkami. Dalsze badania w kierunku funkcji jakie pełni w ustroju wykazały, że EGF jest silnym stymulatorem produkcji DNA i RNA. EGF pobudza proces proliferacji komórek nabłonkowych i nienabłonkowych [16, 17, 28, 31, 53], regulując w ten sposób procesy



gennych prostaglandyn [16, 17, 84]. Podawanie samego EGF bez współdziałania z czynnikami uszkodzającymi nie wpływa na generację prostaglandyn w błonie śluzowej żołądka [16, 17]. Wiadomym jest fakt, że podawany doustnie EGF nie hamuje sekrecji żołądkowej kwasu i pepsyny, a pomimo to wykazano skuteczność tego czynnika w zapobieganiu uszkodzeniom zależnym od obecności kwasu np. wrzodów aspirynowych i stresowych [17, 85]. Antysekrecyjny wpływ EGF po podaniu parenteralnym nie może tłumaczyć jego udziału w zapobieganiu ostrym uszkodzeniom np. etanolem, gdyż rozwój tych uszkodzeń nie zależy od obecności kwasu, a wiąże się raczej z bezpośrednim działaniem etanolu na komórki błony śluzowej żołądka oraz z uszkodzeniem naczyń mikrokrążenia tej błony.

Ostatnie badania wykazały, że efekt protekcyjny EGF i pobudzający wpływ tego czynnika na syntezę DNA zależy częściowo od poliamin [85]. Dowodem na to, że interakcja między EGF a poliaminami odgrywa istotną rolę w protekcji żołądka, przeciwko ostrym uszkodzeniom stresowym, są badania z  $\alpha$ -difluorometyloornityną (DFMO), która jest inhibitorem dekarboksylazy ornitynowej (ODC) – kluczowego enzymu biosyntezy poliamin. Wcześniejsze badania Feldmana i współpracowników [49] wykazały bowiem, że EGF stymuluje aktywność dekarboksylazy ornitynowej i przez to zwiększa produkcję poliamin. W badaniach Konturka i współpracowników [85], stosowanie DFMO, znosiło protekcyjny wpływ EGF na rozwój uszkodzeń stresowych, dowodząc, że poliaminy pośredniczą w ochronnych właściwościach tego czynnika. Usunięcie ślinianek wzmagало wrażliwość błony śluzowej żołądka na działanie stresu i pojawienie się uszkodzeń, a efektowi temu u szczurów z zachowaną biosyntezą poliamin zapobiegano podając egzogenny EGF. W przypadku zablokowania endogennych poliamin przez DFMO, działanie gastroochronne EGF ulegało zniesieniu.

Wyniki powyższych badań dotyczące gastroprotekcyjnego wpływu EGF przeciw powstawaniu ostrych uszkodzeń nie koniecznie można odnieść bez zastrzeżeń do efektów tego peptydu na gojenie przewlekłych uszkodzeń błony śluzowej języka lub żołądka. Okazało się bowiem, że cytoprotekcyjna zdolność prostaglandyn nie odgrywa istotnej roli w procesie gojenia przewlekłych uszkodzeń [14]. Niepowodzeniem zakończyły się też próby zastosowania, w dawkach cytoprotekcyjnych (nie hamujących wydzielania żołądkowego), prostaglandyn naturalnych lub ich stałych analogów zarówno w przypadku leczenia eksperymentalnych wrzodów octowych żołądka i dwunastnicy u szczurów [14] oraz u ludzi z czynną postacią wrzodu żołądka czy dwunastnicy [86].

Ponieważ udział prostaglandyn w procesie gojenia jest kwestionowany, zapewne inne czynniki i mechanizmy są odpowiedzialne za dynamikę tego procesu. W związku z tym postanowiłam sprawdzić, czy EGF przyspiesza gojenie przewlekłych wrzodów językowych i żołądkowych. Zastosowałam w tym celu zmodyfikowaną metodę Okabe i współpracowników [74] do wywoływania tych uszkodzeń w błonie śluzowej żołądka i przystosowałam tę technikę do wywoływania przewlekle gojących się uszkodzeń językowych. Według oryginalnych założeń tej metody, w celu wywołania wrzodu octowego stosowano podśluzówkową iniekcję 100% kwasu octowego lub przykładano na surowicówkę żołądka 70  $\mu$ l 100% kwasu octowego przez okres 60 sekund [74]. Niemal natychmiast powstawały martwicze uszkodzenia błony śluzowej oraz błony podśluzowej, które po 2–3 dniach przechodziły w trudno gojące się przewlekle owrzodzenia śluzówki, z wyraźną tendencją do perforacji i penetracji w kierunku przyległych organów (głównie wątroby i śledziony). Stwierdzono, że wrzodom tym towarzyszą hipersekrecja soku żołądkowego i zaburzenia ze strony opróżniania żołądkowego. Zaletą tego modelu było występowanie makroskopowych i mikroskopowych analogii w stosun-

ku do przewlekłych wrzodów trawiennych występujących u ludzi. Podstawowymi cechami tych wrzodów jest okresowa nawrotowość i chroniczność. Zmodyfikowałam więc metodę Okabe i skróciłam czas ekspozycji kwasu octowego na błonie surowiczej do 20 sekund, a po usunięciu kwasu przemywałam żołądek letnią solą fizjologiczną i dokładnie go osuszałam. Zapobiegało to perforacji, zaś wrzody, w zależności od wyjściowych rozmiarów, ulegały w ciągu około 2–3 tygodni całkowitemu wygojeniu. W przypadku owrzodzeń językowych wydłużyłam czas ekspozycji kwasu octowego do 60 sekund. Wstępne badania z krótszą ekspozycją języka na ten kwas wykazały jedynie obecność powierzchniowych uszkodzeń, gojących się w ciągu 3–4 dni. Po zastosowaniu tych modyfikacji wrzody językowe goiły się niemal całkowicie w ciągu 11 dni, a więc krócej niż wrzody żołądkowe o tych samych wyjściowych rozmiarach. Przypuszczalnie o szybszym tempie gojenia się uszkodzeń w tym obszarze decyduje obecność bogatszego unaczynienia śluzówki języka i jej stały kontakt ze śliną obfitującą w różne czynniki ochronne, w tym głównie EGF.

Badania immunohistochemiczne wykazały, że EGF jest syntetyzowany przez komórki pęcherzykowe i przewody wyprowadzające ślinianek, a uwalniany wraz ze śliną do przewodu pokarmowego [32, 33, 34, 35, 36, 37]. Niewielkie ilości EGF występują również w błonie śluzowej żołądka, przy czym nie określono dotychczas czy jest on produkowany przez komórki śluzówki żołądka czy też gromadzi się w nich w wyniku adsorpcji ze światła przewodu pokarmowego.

Wyniki moich badań dowodzą, że EGF znacząco przyspiesza proces gojenia się wrzodów żołądkowych i językowych. Obserwacja ta potwierdza rezultaty wcześniejszych doświadczeń prowadzonych w Instytucie Fizjologii a dotyczących skuteczności EGF w przyspieszaniu gojenia przewlekłych wrzodów żołądkowo-dwunastniczych, zachodzącego w warunkach wzrostu

syntezy DNA i RNA [28]. W badaniach tych EGF stumulował proliferację komórek błony śluzowej i syntezę RNA i DNA. Tłumaczy to jego udział w procesie gojenia. W moich badaniach EGF przyspieszał gojenie wrzodów także po jego podaniu doustnym, co w zasadzie wyklucza udział wydzielania żołądkowego HCl i pepsyny w tym gojeniu. Wcześniejsze prace dowiodły bowiem, że EGF działa antysekrecyjnie tylko po podaniu parenteralnym, natomiast nie wykazuje tych właściwości przy podaniu doustnym lub dożołądkowym [16, 17, 28].

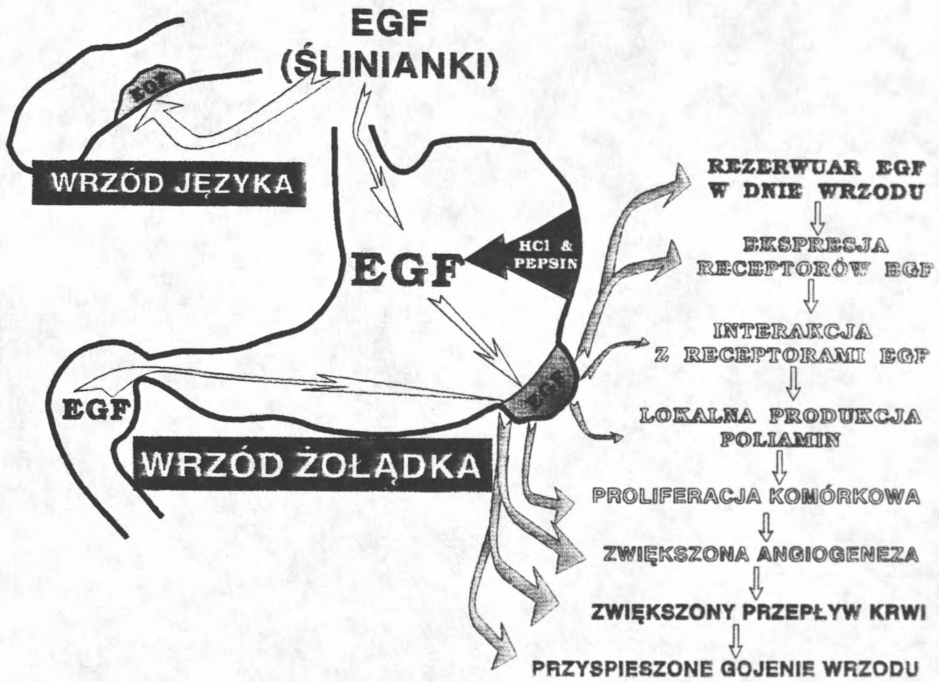
Usunięcie ślinianek prowadzi – uwzględniając poprzednie doniesienia – do znacznego spadku zawartości EGF w śluzówce żołądka [27, 28]. Porównując szybkość gojenia u zwierząt z zachowanymi śliniankami mogłam doświadczalnie stwierdzić, że usunięcie gruczołów ślinowych wyraźnie hamowało gojenie owrzodzeń żołądka i języka. Wcześniej podobne efekty w gojeniu wrzodów u zwierząt po sialadenektomii, otrzymali Olsen i współpracownicy [26, 27], a badania Skinnera [56] dowiodły, że usunięcie ślinianek prowadzi do atrofii śluzówki i że zjawisku temu przeciwdziała egzogennie podawany EGF lub ślina z jego zawartością. W moich badaniach podawanie egzogenego EGF zwierzętom bezśliniankowym znosiło efekt opóźnienia gojenia wrzodów żołądka i języka, spowodowany usunięciem tych gruczołów.

Zachowanie odpowiedniego przepływu krwi jest jednym z najważniejszych czynników wpływających na integralność błony śluzowej żołądka oraz cytoprotekcję [9, 73]. Ostatnie publikacje również potwierdzają znaczenie przepływu krwi w bezpośrednim otoczeniu wrzodu [87] dla prawidłowego procesu gojenia się owrzodzenia. Powstawanie naczyń na brzegu uszkodzenia oraz w tkance ziarninowej w dnie wrzodu i w następstwie tego wzrost szybkości przepływu krwi wspomaga proces gojenia. Za główny element tego procesu uważa się – obok zwiększonej syntezy fibroblastów i proliferacji – także zwiększony dowóz tlenu i składników odżywczych. Niemale

znaczenie w utrzymaniu prawidłowego przepływu krwi, w miejscu wytworzonego owrzodzenia, wydaje się mieć otrzewna pobudzająca angiogenezę w tkance ziarninowej dna wrzodu [11].

W mojej pracy, zmniejszenie się wielkości owrzodzenia języka i żołądka, świadczące o postępującym gojeniu, było ściśle skorelowane właśnie ze wzrostem przepływu krwi w obrębie tego uszkodzenia. Owrzodzenia języka, w których wzrastał przepływ goiły się szybciej niż wrzody żołądka, gdzie zmniejszony przepływ krwi i różnica w tym przepływie pomiędzy brzegiem a dnem wrzodu utrzymywała się niemal do końca procesu gojenia, czyli do 14-ego dnia po jego wywołaniu. W przypadku owrzodzeń językowych różnica ta występowała już w dniu wywołania zmiany. Największą wartość osiągała w 2-gim dniu doświadczenia, ale już w 6-tym przepływ krwi w brzegu nie różnił się znamienne od przepływu w dniu owrzodzenia, uzyskując wyższe wartości niż przepływ w nie uszkodzonej błonie śluzowej języka. Wyniki tych obserwacji sugerują, iż przyspieszone gojenie owrzodzeń języka jest wynikiem większego, niż w żołądku przepływu krwi w obrębie tego uszkodzenia. Jest to prawdopodobnie związane z nasiloną angiogenezą, która występuje na skutek stałego kontaktu owrzodzenia z dużym stężeniem EGF, wydzielanym wraz ze śliną. Dzieje się tak zwłaszcza w otoczeniu wrzodu języka, gdyż dostający się do żołądka, wraz ze śliną, EGF ulega częściowej inaktywacji przez kwas solny i pepsynę [18]. Jego działanie stymulujące proliferację komórkową i przepływ krwi w tkance ziarninowej w obrębie uszkodzenia jest więc odpowiednio słabsze, co wpływa na wolniejszy przebieg procesu gojenia w żołądku (Ryc. 28).

Z najnowszych badań wynika, że EGF i jego receptory wykryto w śluzówce żołądka, w bezpośrednim otoczeniu wrzodu [88, 89]. Tarnawski i Stachura [89] wykazali, w badaniach immunocytochemicznych, że receptory EGF występują w nie zmienionej błonie śluzowej żołądka, w strefie prolifera-



Ryc.28. Schemat przedstawiający mechanizmy działania EGF na proces gojenia owrzodzeń języka i żołądka

cji gruczołów, a w okresie gojenia wrzodu (wywołanego kwasem octowym) ekspresja tych receptorów w brzegu wrzodu wzrasta wielokrotnie i utrzymuje się jeszcze po utworzeniu blizny powrzodowej. Niewykluczone, że EGF współdziała z innymi czynnikami wzrostowymi takimi jak bFGF – który również pobudza wzrost fibroblastów oraz posiada silniejszy niż EGF wpływ na angiogenezę [90]. W opublikowanych niedawno badaniach Wrighta i współpracowników [91] przedstawiono dowody na powstawanie, w obrębie wrzodów w przewodzie pokarmowym, nowej linii komórek zdolnych do sekrecji EGF. Komórki te mają być odpowiedzialne za lokalną produkcję i sekrecję tego czynnika w odpowiedzi na naruszenie ciągłości bariery śluzowej i

rozwój owrzodzenia. Wydaje się więc bardzo prawdopodobnym, że zwiększona ekspresja EGF i jego receptorów w obrębie owrzodzeń błony śluzowej żołądka pobudza mechanizm odnowy komórkowej, wzmacnia proliferację i migrację komórek żołądkowych oraz proces nabłonkowania i tworzenia blizny, przyspieszając w ten sposób gojenie.

Poza EGF i bFGF pewne znaczenie w procesach proliferacyjnych i naprawczych błony śluzowej może mieć także transformacyjny czynnik wzrostu alfa ( $TGF\alpha$ ). Ostatnie badania Polka i współpracowników [92] zdają się potwierdzać rolę lokalnie produkowanego  $TGF\alpha$  w protekcji błony śluzowej przed uszkodzeniem.  $TGF\alpha$ , obok EGF, należy do najsilniejszych czynników pobudzających wzrost komórkowy, a jednocześnie wykazuje znaczne podobieństwo strukturalne do EGF. Działa także na ten sam co EGF receptor w błonie śluzowej żołądka. Polk [92] wykazał zwiększoną ekspresję TGF mRNA i zwiększone uwalnianie  $TGF\alpha$  po uszkodzeniu błony śluzowej żołądka przez taurocholan sodu. Nie stwierdził jednak, w tych samych warunkach doświadczalnych, zwiększonej ekspresji EGF i jego receptorów. Podważałoby to istotną rolę EGF w procesach protekcji i gojenia błony śluzowej żołądka. Wprawdzie uszkodzenia solami żółciowymi nie mogą być odnoszone do przewlekłych wrzodów np. octowych, ale fakt, że nie udało się wykazać w błonie śluzowej ekspresji EGF mógłby wskazywać, iż poprzednio obserwowane zwiększone stężenie EGF w obrębie wrzodu jest raczej konsekwencją gromadzenia EGF ze światła żołądka niż wynikiem zwiększonej produkcji tego peptydu w uszkodzonej wrzodem błonie śluzowej. Wyniki badań doświadczalnych wykazują kilkakrotnie większe wiązanie znakowanego radioaktywnym jodem EGF z niszą wrzodową żołądka, niż z sąsiadującą z wrzodem, nienaruszoną błoną śluzową [28]. To wiązanie EGF w obrębie wrzodu może stanowić ważny rezerwuar tego czynnika pobudzającego lokalne procesy odnowy i gojenia wrzodu.

Do najważniejszych czynników endogennych, które regulują wzrost komórkowy zalicza się poliaminy, głównie sperminę i putrescynę. Czynniki te, podobnie jak EGF i TGF $\alpha$ , wzmagają syntezę kwasów rybonukleinowych i pobudzają proces proliferacji komórek błony śluzowej [50, 93]. Ponieważ EGF stymuluje dekarboksylazę ornitynową, główny enzym biosyntezy poliamin [85], zdecydowałam się zbadać czy istnieje wzajemna interakcja pomiędzy tymi substancjami a EGF. W moich badaniach DFMO, nieodwracalny inhibitor ODC i syntezy poliamin [93], nieznacznie tylko wpływał na szybkość gojenia owrzodzeń języka, ale wyraźnie opóźniał gojenie wrzodów żołądka. Świadczy to o tym, że endogenne poliaminy uczestniczą raczej w procesach gojenia błony śluzowej żołądka niż języka. Wyniki moich badań wskazują na szersze spektrum działania EGF niż poliamin, gdyż EGF przyspieszał gojenie uszkodzeń zarówno na języku, jak i w żołądku. Gdy jednocześnie stosowano DFMO to w większym stopniu eliminowano efekt gojenia wywołany przez EGF w żołądku niż na języku. To odwrócenie przyspieszającego wpływu EGF na gojenie wrzodów żołądka przez DFMO zaznaczyło się wyraźnie zarówno u zwierząt bezśliniankowych, jak i z zachowanymi śliniankami, wskazując tym samym na pośredniczącą rolę poliamin w mechanizmie gojenia się owrzodzeń żołądkowych pod wpływem EGF. Wyniki te potwierdzają wcześniejsze badania [85] odnośnie udziału poliamin w gastroprotekcijnym działaniu EGF przeciwko uszkodzeniom stresowym. Efekt zniesienia protekcji EGF przez DFMO korelował w tych badaniach [85] z całkowitym zahamowaniem aktywności ODC. Biorąc pod uwagę poprzednie i prezentowane w tej samej pracy wyniki można uznać pośredniczącą rolę poliamin w procesach zarówno protekcji poprzedzających powstawanie ostrych uszkodzeń, jak i gojenia przewlekłych wrzodów przez EGF.

Jak wspomniano we wstępie, nie jest w pełni wyjaśnione czy prostaglandyny, odznaczające się silnym działaniem gastroprotekcyj-



nym [11, 12, 13, 73], uczestniczą w procesie gojenia wrzodów pod wpływem EGF. Nie ulega wątpliwości, że zahamowanie endogennej syntezy prostaglandyn przez indometacynę [87] opóźnia proces gojenia. Mechanizm tego działania indometacyny nie jest całkowicie wyjaśniony, chociaż tłumaczy się go spadkiem zawartości prostaglandyn, szczególnie w brzegu owrzodzenia i zmniejszeniem przepływu krwi w tym obszarze [87]. Moje badania w pełni potwierdzają hamujące działanie indometacyny na gojenie przewlekłych wrzodów żołądka, wywołanych kwasem octowym. Powierzchnia tych wrzodów (po upływie 7 dni) była u szczurów leczonych indometacyną około 2-3 razy większa, aniżeli u zwierząt kontrolnych, którym nie podawano tego środka. EGF stosowany u zwierząt otrzymujących indometacynę był jednak tak skuteczny, jak u zwierząt, którym jej nie podawano. Na podstawie tych wyników można wnioskować, że endogenne prostaglandyny mają wprawdzie istotne znaczenie w gojeniu wrzodów żołądka, ale nie wpływają na przyspieszenie tego gojenia przez EGF. Dowodzi to, że brak jest interakcji na proces gojenia między prostaglandynami a EGF.

Z badań przeprowadzonych przez Konturka [94] wynika, że indometacyna nie wpływa zasadniczo na przepływ krwi w brzegu owrzodzenia. W przeciwieństwie do obserwacji Hirose i współpracowników [87] jej działanie, opóźniające proces gojenia, nie zależy od redukcji przepływu krwi w brzegu uszkodzenia. Wiąże się jednak prawdopodobnie z innymi, dotychczas jeszcze nie wyjaśnionymi mechanizmami i czynnikami. Przypuszczalnie głównym czynnikiem opóźniającym gojenie wrzodów przez indometacynę jest zmniejszenie kumulacji EGF w obrębie wrzodu, spowodowane obniżonym wiązaniem EGF przez receptory w tkance ziarninowej, w obrębie wrzodu [95]. Efekt działania indometacyny sprowadza się zatem do spadku gromadzenia i działania EGF w procesie gojenia.

Reasumując, ustawicznie produkowany przez ślinianki i wydzielany ze śliną EGF gromadzi się w obrębie ubytków błony śluzowej wyściełającej jamę ustną oraz żołądek. Tworzy się tam miejscowy rezerwuar EGF działającego poprzez swoiste receptory pobudzająco na biosyntezę poliamin, proliferację komórek i angiogenezę w tkance ziarninowej (Ryc. 28). Procesy te prowadzą do wzrostu przepływu krwi w otoczeniu wrzodu, przyspieszając jego gojenie.

# W N I O S K I

1. Owrzodzenia błony śluzowej jamy ustnej i żołądka mają podobny charakter pod względem morfologicznym i wykazują podobny przebieg gojenia.
2. EGF zarówno pochodzenia egzogenego jak i endogennie wydzielany przez ślinianki, przyspiesza gojenie przewlekłych owrzodzeń błony śluzowej języka i żołądka.
3. Rozwojowi owrzodzeń błony śluzowej języka i żołądka towarzyszy początkowa redukcja przepływu krwi w miejscu uszkodzenia, szczególnie w jego dnie, natomiast proces gojenia przebiega równolegle do wzrostu tego przepływu.
4. Proces gojenia owrzodzeń języka zachodzi szybciej niż gojenie wrzodów żołądka. Wiąże się to z większym, niż w żołądku przepływem krwi w obrębie uszkodzonej śluzówki języka.
5. Zahamowanie cyklooksygenazy prostaglandynowej przez indometacynę znacznie opóźnia proces gojenia owrzodzeń języka i żołądka, co wskazuje na udział endogennych prostaglandyn w procesie gojenia.

6. Działanie EGF pobudzające proces gojenia zachodzi, szczególnie w przypadku wrzodów żołądka, za pośrednictwem stymulacji dekarboksylazy ornitynowej i poliamin.
7. EGF może mieć znaczenie i zastosowanie w leczeniu owrzodzeń jamy ustnej i żołądka, przyspieszając proces odnowy i regenerację błony śluzowej.

# STRESZCZENIE

Błona śluzowa wyściełająca górny odcinek przewodu pokarmowego jest ustawicznie narażona na działanie czynników drażniących i wrzodotwórczych. Powstawaniu uszkodzeń zapobiega jednak szereg sprzężonych ze sobą mechanizmów, a szczególnie ciągle wydzielanie alkalicznego śluzu, wysoki przepływ krwi oraz szybka odnowa komórek błony śluzowej. Istotne znaczenie dla bariery śluzówkowej ma generacja endogennych prostaglandyn oraz uwalnianie epidermalnego czynnika wzrostu (EGF).

Udział EGF i prostaglandyn w procesie gojenia wrzodów żołądka jest stosunkowo dobrze poznany, natomiast niewiele wiadomo o ich roli i znaczeniu w gojeniu owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej.

Celem mojej pracy było:

1. Opracowanie modelu doświadczalnego przewlekłych owrzodzeń jamy ustnej (języka) i porównanie dynamiki gojenia tych wrzodów z szybkością gojenia się wrzodów żołądka.
2. Określenie roli przepływu krwi w procesie gojenia tych dwóch typów owrzodzeń.
3. Zbadanie roli i znaczenia EGF, poliamin i prostaglandyn w procesie gojenia.

Badania przeprowadziłam na 380 szczurach białych rasy Wistar, u których wywoływałam, przy użyciu kwasu octowego, wrzody języka i żołądka. Rozwijały się one niemal natychmiast po zastosowaniu tego kwasu, nabierając, po upływie 2–3 dni, charakteru wrzodów przewlekłych.

Gojenie wrzodów języka trwało 11 dni, zaś wrzody żołądka goiły się w ciągu 21 dni.

W przypadku wrzodów języka, bezpośrednio po ich wywołaniu obserwowałam spadek wartości przepływu krwi w obrębie dna i brzegu owrzodzenia, ale w następnych dniach występował znaczny wzrost tego przepływu utrzymujący się przez cały okres gojenia. Tymczasem przepływ krwi w obrębie wrzodu żołądka, zwłaszcza w jego dnie, był obniżony przez cały okres trwania obserwacji i narastał wolniej, powracając do stanu wyjściowego dopiero w 14-tym dniu.

Usunięcie ślinianek – głównego źródła endogennego EGF – nie wpływało zasadniczo na dynamikę gojenia owrzodzeń języka, ale stosowanie egzogennego EGF, przyspieszało ten proces zarówno u szczurów z usuniętymi, jak i zachowanymi śliniankami. Przeprowadzone badania wykazały, że nie zachodzi wzajemna interakcja pomiędzy EGF a poliaminami, ponieważ przyspieszający wpływ EGF na proces gojenia zachodził również w obecności  $\alpha$ -difluorometyloornityny (DFMO) – blokera dekarboksylazy ornitynowej, kluczowego enzymu w syntezie poliamin. W przeciwieństwie do tego, stosowanie indometacyny, inhibitora syntezy prostaglandyn, spowodowało znaczne zahamowanie procesu gojenia, co wskazuje na istotną rolę prostaglandyn w tym procesie.

W przypadku wrzodów żołądka, usunięcie ślinianek znacznie zwalniało proces gojenia, a stosowanie EGF u zwierząt zarówno z zachowanymi, jak i usuniętymi gruczołami ślinowymi przyspieszało ten proces. Stosowanie DFMO w znacznym stopniu eliminowało szybkość gojenia wrzodów

żołądka u zwierząt otrzymujących EGF. Podawanie EGF przywracało prawidłowe gojenie, mimo stosowania indometacyny, zarówno u zwierząt bezśliniankowych jak i z zachowanymi śliniankami. Wskazuje to na brak udziału endogennych prostaglandyn w pobudzającym gojenie wrzodów działaniu EGF.

Na podstawie powyższych wyników wnioskuję, że owrzodzenia błony śluzowej języka i żołądka mają podobny pod względem morfologicznym charakter, ale inną dynamikę gojenia. Prawdopodobnie wiąże się to z różnicami w przepływie krwi w obu rodzajach owrzodzeń.. W przypadku wrzodów języka, przepływ krwi jest znacznie wyższy i ma to większe znaczenie w gojeniu tych wrzodów niż wrzodów żołądka.

Reasumując, zarówno w gojeniu wrzodów języka, jak i żołądka, znaczącą rolę odgrywają czynniki fizjologiczne takie jak EGF i prostaglandyny, które wzmagają szybkość tego procesu poprzez stymulację przepływu krwi oraz przez przyspieszanie procesów regeneracji błony śluzowej i angiogenezy.

# PIŚMIENICTWO

1. Tasman-Jones C.: *Pathogenesis of peptic ulcer disease and gastritis: Importance of aggressive and cytoprotective factors.*  
Scand.J.Gastroenterol., 1986; 21, 1-5.
2. Davenport H.W.: *The gastric mucosal barrier.*  
Digestion, 1972; 5, 162
3. Ivey K.J.: *Gastric mucosal barrier.*  
Gastroenterology, 1971; 61, 247.
4. Davenport H.W.: *Gastric mucosal injury by fatty and acetylosalicylic acids.*  
Gastroenterology, 1964; 46, 245-252.
5. Takagi K., Okabe S.: *The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer.*  
Jpn. J. Pharmacol., 1968; 18, 9-18.
6. Eastwood G.L., Kirchner J.P.: *Changes in the fine structure of mouse gastric epithelium produced by ethanol and area.*  
Gastroenterology, 1974; 67, 71.
7. Forte T.M., Silen W., Forte J.G.: *Ultrastructural lesions in gastric mucosa exposed to deoxycholate. Implications towards the barrier concept.*  
In: Gastric Hydrogen Ion Secretion.  
Kasbekar D.K., Sachs G., Rehm W.S. Eds. Marcell Dekker, New York, 1976; 1.
8. Svanes K., Ito S., Takeuchi K., Silen W.: *Restitution of the surface epithelium of the in vitro frog gastric mucosa after damage with hyperosmolar sodium chloride.*  
Gastroenterology, 1982; 82, 1409-1426.
9. Konturek S.J.: *Gastric cytoprotection.*  
Scand.J.Gastroenterol., 1985; 20, 543-553.
10. Silen W.: *Experimental models of gastric ulceration and injury.*  
Am. J. Physiol., 1988; 18, G395-G402.



11. Robert A., Nezamis J.E., Lancaster C., Hauchar A.J.: *Cytoprotection by prostaglandins in rats: prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury.* Gastroenterology, 1979, 77, 433-443.
12. Robert A.: *Cytoprotection and prostaglandins.* Gastroenterology, 1979; 77, 761-767.
13. Konturek S.J., Brzozowski T., Piastucki I., Radecki T., Dembiński A., Dembińska-Kieć A.: *Role of locally generated prostaglandins in adaptive gastric cytoprotection.* Dig.Dis.Sci., 1982; 27, 967-971.
14. Konturek S.J., Stachura J., Radecki T., Drozdowicz D., Brzozowski T.: *Cytoprotective and ulcer healing properties of prostaglandin E, colloidal bismuth and sucralfate in rats.* Digestion, 1987; 38, 103-113.
15. Konturek S.J., Brzozowski T., Dembiński A., Warzecha Z., Drozdowicz D.: *Comparison of solcoseryl and epidermal growth factor (EGF) in healing of chronic gastroduodenal ulceration and mucosal growth in rats.* Hepato-gastroenterology, 1988; 35, 25-29.
16. Konturek S.J., Radecki T., Brzozowski T., Piastucki I., Dembiński A., Dembińska-Kieć A., Żmuda A., Gryglewski R., Gregory H.: *Gastric cytoprotection by epidermal growth factor. Role of endogenous prostaglandins and DNA synthesis.* Gastroenterology, 1981; 81, 438-443.
17. Konturek S.J., Brzozowski T., Piastucki I., Dembiński A., Radecki T., Dembińska-Kieć A., Żmuda A., Gregory H.: *Role of mucosal prostaglandins and DNA synthesis in gastric cytoprotection by luminal epidermal growth factor.* Gut, 1981; 22, 927-932.
18. Cohen S.: *Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal.* J.Biol.Chem., 1962; 237, 1555.
19. Cohen S.: *The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF).* Develop.Biol., 1965;t12, 394.
20. Gregory H.: *Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor.* Nature, 1975; 257, 325.
21. Gregory H., Preston B.M.: *The primary structure of human urogastrone.* Int. J.Pept.Protein Res., 1977; 9, 107.
22. Taylor J.M., Cohen S., Mitchell W.M.: *Epidermal growth factor: High and low molecular weight forms.* Proc. Natl.Acad.Sci., 1970; 67, 164.
23. Savage C.R., Inagami T., and Cohen S.: *The primary structure of epidermal growth factor.* J.Biol.Chem., 1972; 247, 7612-7618.
24. Gregory H., Bower J.M., Willshire I.R.: *Urogastrone and epidermal growth factor.* FEBS Collog., 1978;t48, 75-84.

25. Carpenter G.: *Epidermal growth factor*.  
Ann.Rev.Biochem., 1979; 48, 193-216.
26. Olsen P.S., Poulsen S.S., Therkelsen K., Nexø E.: *Oral administration of synthetic human urogastrone promotes healing of chronic duodenal ulcers in rats*.  
Gastroenterology, 1986; 90, 911-917.
27. Olsen P.S., Poulsen S.S., Kirkegaard P., Nexø E.: *Role of submandibular saliva and epidermal growth factor in gastric cytoprotection*.  
Gastroenterology, 1984; 87, 103.
28. Konturek S.J., Dembiński A., Warzecha Z., Brzozowski T., Gregory H.: *Role of epidermal growth factor in healing of chronic gastroduodenal ulcers in rats*.  
Gastroenterology, 1988; 94, 1300-1307.
29. Kirkegaard P., Olsen P.S., Poulsen S.S., Nexø E.: *Epidermal growth factor inhibits cysteamine-induced duodenal ulcer*.  
Gastroenterology, 1983; 85, 1277-1283.
30. Carpenter G.: *Epidermal growth factor is major growth promoting agent in human milk*.  
Science, 1980; 210, 198.
31. Dembiński A., Gregory H., Konturek S.J., Polański M.: *Trophic action of epidermal growth factor on the pancreas and gastroduodenal mucosa in rats*.  
J.Physiol. (Lond), 1982; 325, 35-42.
32. Elder J.B., Williams A., Lacey E., Gregory H.: *Cellular localization of human urogastrone (epidermal growth factor)*.  
Nature, 1978; 271, 466-467.
33. Gregory H., Walsh S., Hopkins C.R.: *The identification of urogastrone in serum, saliva and gastric juice*.  
Gastroenterology, 1979; 77, 313-318.
34. Thesleff I., Viinikka L., Saxen L., Lehtonen E., and Perheentupa J.: *The parotid gland is the main source of human salivary epidermal growth factor*.  
Life Sciences, 1988; 43, 13-18.
35. Heitz P.H.U., Kasper M., Van Noorden S., Polak J.M., Gregory H., and Pearse A.G.E.: *Immunohistochemical localization of urogastrone to human duodenal and submandibular glands*.  
Gut, 1978; 19, 408-413.
36. Kasselberg A.G., Orth D.N., Gray M.E. and Stahlman M.T.J.: *Immunocytochemical localization of human epidermal growth factor/urogastrone in several human tissues*.  
J.Histochem., Cytochem., 1985; 33, 315-322.
37. Olsen P.S., Nexø E.: *Quantitation of epidermal growth factor in the rat. Identification and partial characterization of duodenal EGF*.  
Scand. J.Gastroenterol., 1983; 18, 771-776.
38. Hirata Y., Orth D.N.: *Epidermal growth factor (urogastrone) in human tissues*.  
J.Clin.Endocrinol.Metab., 1979; 667-672.

39. Hirata Y., Uchihashi M., Nakajima M.: *Immunoreactive human epidermal growth factor in human pancreatic juice.*  
J.Clin.Endocrinol. Metab., 1982; 54, 1242-1245.
40. Starkey R.H., Cohen S., Orth D.N.: *Epidermal growth factor. Identification of a new hormone in human urine.*  
Science, 1979; 189, 800.
41. Ances I.G.: *Serum concentrations of epidermal growth factor in human pregnancy.*  
Am.J.Obstet.Gynecol., 1973; 115, 357.
42. Byyny R.L., Orth D.N., Cohen S., Doyne E.S.: *Epidermal growth factor: effects of androgens and adrenergic agents.*  
Endocrinology, 1974; 95, 776-782.
43. Olsen P.S., Poulsen S.S., Kirkegaard P.: *Adrenergic effects on secretion of epidermal growth factor from Brunner's glands.*  
Gut, 1985; 26, 920-927.
44. Olsen P.S., Kirkegaard P., Poulsen S.S., Nexø E.: *Vasoactive intestinal polypeptide and acetylcholine stimulate exocrine secretion of epidermal growth factor from submandibular gland.*  
Regul.Peptides, 1986; 15, 37-46.
45. Tovey F.: *Progress report: peptic ulcer in India and Bangladesh.*  
Gut, 1979; 20, 329-347.
46. Malhotra S.L.: *Peptic ulcer disease in India and its etiology.*  
Gut, 1964; 5, 412-416.
47. Malhotra S.L.: *Epidemiological study of peptic ulcer in the south of India.*  
Gut, 1967; 8, 180-188.
48. Johnson L.R., Guthrie P.D.: *Stimulation of rat oxyntic gland mucosal growth by epidermal growth factor.*  
Am.J.Physiol., 1987 lub 1978; 238, G45.
49. Feldman E.J., Aures D., Grossman M.I.: *Epidermal growth factor stimulates ornithine decarboxylase activity in the digestive tract of the mouse (40357).*  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 1978; 159, 400.
50. Thirumalai C.H., Tseng C-C., Tabata K., Fitzpatrick L.R., Johnson L.R.: *Relationship between ornithine decarboxylase activity and gastric damage.*  
Am.J.Physiol., 1987; 253, G1.
51. Lembach K.J.: *Enhanced synthesis and extracellular accumulation of hyaluronic acid during stimulation of quiescent human fibroblasts by mouse epidermal growth factor.*  
J.Cell.Physiol., 1976; 89, 277-288.
52. Chen L.B., Gudor R.C., Sun T.T., Chen A.B., Mosesson M.W.: *Control of a cell surface major glycoprotein by epidermal growth factor.*  
Science, 1977; 197, 776-778.

53. Dutla S.K., Matossian H., Hamburger A., Vaeth J., Halsko J.: *Effect of low concentrations of epidermal growth factor and human saliva on cellular proliferation of gastric mucosa explants.*  
Gastroenterology, 1987; 92, 1378.
54. Ulshen M.H., Lyn-Cook L.E., Raasch R.H.: *Effects of intraluminal epidermal growth factor on mucosal proliferation in the small intestine of adult rats.*  
Gastroenterology, 1986; 91, 1134-1140.
55. Olsen S.P., Poulsen S.S., Therkelsen K., Nexø E.: *Effect of sialoadenectomy and synthetic human urogastrone on healing of chronic gastric ulcers in rats.*  
Gut, 1986; 27, 1443-1449.
56. Skinner K.A., Soper B.D., Tepperman B.L.: *Effect of sialoadenectomy and salivary gland extracts on gastrointestinal mucosal growth and gastrin levels in the rat.*  
J.Physiol. (Lond), 1984; 351, 1-12.
57. Knychalska-Karwan Z.: *Diagnostyka różniczkowa owrzodzeń błony śluzowej jamy ustnej.*  
Stomat.Klin., 1979; III, 39-46.
58. Knychalska-Karwan Z., Pietruszka M.: *Owrzodzenia błony śluzowej jamy ustnej.*  
Czas Stomat., 1980; XXXIII, 4, 377-382.
59. Wesson C.: *Oral ulceration as the first symptom diabetes.*  
Oral Surg., Oral Med., Oral Path., 1968; 25, 5, 686.
60. Bottomley W., Perlin E., Ross G.: *Antineoplastic agents and their oral manifestations.*  
Oral Surg., Oral Med., Oral Path., 1977; 44, 4, 527.
61. Brown R., Bolas G.: *Isoprenaline ulceration of the tongue.*  
Brit.Dent.J., 1973; 134, 8, 336.
62. Kennett S.: *Stomatitis medicamentosa due to barbiturates.*  
Oral Surg., Oral Med., Oral Path., 1968; 25, 3, 351.
63. Kartenian K., Stenger T.: *Postanaesthetic palatal ulceration.*  
Oral Surg., Oral Med., Oral Path., 1976; 42, 4, 447.
64. Cawson R.: *Oral ulceration clinical aspects.*  
Oral Surg., Oral Med., Oral Path., 1972; 33, 6, 934.
65. Cooke E.: *Oral ulceration as a manifestation of some dermatoses.*  
Proceedings of the Royal Society of Medicine., 1965; 58, 6, 455.
66. Scott R.: *Oral ulceration.*  
Proceedings of the Royal Society of Medicine., 1965; 58, 6, 453.
67. Yeoman C., Greenspan J., Harding S.: *Recurrent oral ulceration.*  
Brit.Dent.J., 1978; 144, 4, 114.
68. Biedowa J., Knychalska-Karwan Z.: *Leczenie aft Suttona.*  
Czas Stomat., 1977; XXX, 11, 925-929.
69. Mathis H.: *Reviews of stomatitis: ulcers and ulcerations in the oral cavity due to local causes.*  
Intern.Dent.J., 1956; 6, 2, 151.

70. Itoh M., Joh T., Imai S., Miyamoto T., Matsusako K., Iwai A., Katsumi K., Endo K., Goto K., Takeuchi T.: *Experimental and clinical studies on epidermal growth factor for gastric mucosal protection and healing of gastric ulcer.*  
J.Clin.Gastroenterol., 1988; 10 (suppl 1), S7-S12.
71. Ohmura E., Emoto N., Tsushima T., Watanabe S., Takeuchi T., Kawamura M., Shigemoto M., Shizume K.: *Salivary immunoreactive human epidermal growth factor /IR-hEGF/ in patients with peptic ulcer disease.*  
Hepato-gastroenterol., 1987; 34, 160.
72. Kelly S.M., Crampton J., Hunter J.O.: *Decreased salivary epidermal growth factor in rheumatoid arthritis: a possible mechanism for increased susceptibility to gastric ulceration.*  
Brit. Med. J., 1990; 301, 422-423.
73. Jacobson E.D.: *Direct and adaptive cytoprotection.*  
Dig.Dis.Sci., 1986; 31, 285-315.
74. Okabe S., Pfeiffer C.J., Roth J.L.A.: *A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcers in rats.*  
Am.J.Dig.Dis., 1971; 16, 277-284.
75. Oktaba W.: *Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczalnictwa.*  
PWN, Warszawa, 1966.
76. Hunt T.K., Knighton D.R., Thakral A., Andrews W., Michael D.: *Cellular control of repair in soft and hard tissue repair.*  
Ed.: Hunt T.K., Heppenstall R.B., Pines E., Rovee D., Praeger Publishers, 1984; pp 3-19.
77. Laato M., Niżnikoski J., Gerdin B., Lebel L.: *Stimulation of wound healing by epidermal growth factor, a dose-dependent effect.*  
Ann.Surg., 1986; 203, 379-381.
78. Laato M.: *Effect of epidermal growth factor (EGF) on blood flow and albumin extravasation in experimental granulation tissue.*  
Acta Chir.Scand., 1986; 152, 401-406.
79. Buckley A., Davidson J.M., Kamerath C.D., Woodward S.C.: *Epidermal growth factor increases granulation tissue formation dose-dependently.*  
J.Surg. Res., 1987; 43, 322-328.
80. Ferraro J.M.: *Sucralfate suspension for stomatitis.*  
Drug Intell.Clin.Pharm., 1984; 18, 153.
81. Ferraro J.M.: *Sucralfate suspension for mouth ulcers.*  
Drug Intell.Clin.Pharm., 1985, 19, 480.
82. Solomon M.A.: *Oral sucralfate suspension for mucositis.*  
N.Engl.J.Med., 1986, 315, 459-460.
83. Shenep J.L., Kalwinsky D.K., Hutson P.R., George S.L., Dodge R.K., Blankenship K.R., et al.: *Efficacy of oral sucralfate suspension in prevention and treatment of chemotherapy-induced mucositis.*  
J.Pediatr., 1988; 113, 758-763.

84. Konturek S.J., Brzozowski T., Dembiński A., Warzecha Z., Yamazaki J.: *Gastric protective and ulcer-healing action of epidermal growth factor.*  
W: *Advances in Drug Therapy of Gastrointestinal Ulceration.* Ed: by A.Garner & B.J.R. Whittle 1989 John Wiley & Sons Ltd.
85. Konturek P.K., Brzozowski T., Konturek S.J., Dembiński A.: *Role of epidermal growth factor, prostaglandin and sulfhydryls in stress-induced gastric lesions.*  
*Gastroenterology*, 1990; 99, 1607-1615.
86. Hawkey C.J., Rampton D.S.: *Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa; are they important in the function, disease or treatment.*  
*Gastroenterology*, 1985; 89, 1162-1188.
87. Hirose H., Takeuchi K., Okabe S.: *Effect of indomethacin on gastric mucosal blood flow around acetic acid-induced gastric ulcers in rats.*  
*Gastroenterology*, 1991; 100, 1259-1265.
88. Hansson H.A., Hong I., Helander H.F.: *Changes in gastric EGF, EGF receptors and acidity during healing of gastric ulcer in the rat.*  
*Acta Physiol.Scand.*, 1990; 138, 241-242.
89. Tarnawski A., Stachura J., Durbin T., Sarfeh I.J., Gergely H.: *Increased expression of growth factor receptor during gastric healing in rats.*  
*Gastroenterology*, 1992; 102, 685-690.
90. Folkman J., Szabo S., Stovroff M., McNeil P., Li W., Shing Y.: *Duodenal ulcer. Discovery of a new mechanism and development of angiogenic therapy that accelerates healing.*  
*Ann.Surg.*, 1991; 214, 414-425.
91. Wright N.A., Pike C., George E.: *Induction of a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage by mucosal ulceration in human gastrointestinal stom cells.*  
*Nature*, 1990; 343, 82-85.
92. Polk W.H., Dompsey P.J., Russell W.E., Brown P.I., Beauchamp R.D., Bernard J.A., Coffey R.J.: *Increased production of transforming growth factor and following acute gastric injury.*  
*Gastroenterology*, 1992; 102, 1467-1470.
93. Wang J.-Y., Johnson L.R.: *Role of ornithine decarboxylase in repair of gastric mucosal stress ulcer.*  
*Am.J. Physiol.*, 1990; 258, G78-G85.
94. Konturek S.J.: *Omentum momentum.*  
*Gastroenterology*, 1992; 102, 373-374.
95. Konturek S.J., Brzozowski T., Drozdowicz D., Dembiński A., Nauert Ch.: *Healing of chronic gastroduodenal ulcerations by antacids.*  
*Dig.Dis.Sci.*, 1990; 35, 1121-1129.

