

Aleksandra Szlachcic

ROLA TLENKU AZOTU W REGULACJI TRZUSTKOWEGO PRZEPŁYWU KRWI I
CZYNNOŚCI ZEWNĄTRZWYDZIELNICZEJ ORAZ W PATOMECHANIZMIE OSTREGO
ZAPALENIA TRZUSTKI.

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

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych
z Instytutu Fizjologii Collegium Medicum UJ
(kierownik: Prof. dr hab. med. S.J. Konturek)

Kraków 1994

Bibl. Medyczna CM UJ



1816095369

Panu Prof.dr hab.med. Stanisławowi J. Konturkowi

składam serdeczne podziękowania za okazaną życzliwość,
pomoc i trud włożony w przygotowanie mojej pracy.

S P I S T R E Ś C I

1. Wstęp.
2. Cel i założenia badań.
3. Metodyka wykonanych doświadczeń.
4. Preparaty używane do doświadczeń.
5. Omówienie wyników przeprowadzonych badań.
6. Wykresy i tabele.
7. Dyskusja.
8. Wnioski.
9. Streszczenie.
10. Bibliografia.

W S T E P

Badania mające na celu określenie roli trzustki w procesach trawiennych posiadają stosunkowo krótką historię, niecałe 150 lat temu Bernard dowiódł, że sok trzustkowy psów zawiera substancje niezbędne do rozkładu tłuszczów. W 1890 roku Abelman, fizjolog z pracowni Minkowskiego, dokonując wycięcia trzustki u psów zaobserwował, że następuje nie tylko złe trawienie tłuszczów ale także upośledzeniu ulega trawienie i wchłanianie produktów białkowych. Obecnie wiadomo, że sok trzustkowy zawiera obok wody i elektrolitów, wydzielanych przez komórki śródpecherzykowe i przewodowe, także szereg enzymów trawiennych produkowanych przez komórki pecherzykowe. Trzustka ludzka syntezuje i wydziela więcej protein przypadających na gram tkanki niż jakikolwiek inny narząd oraz dostarcza 6-20 gramów dziennie enzymów trawiennych w średniej objętości około 2.5 l soku. Pod względem funkcjonalnym trzustka traktowana jest jako narząd zewnątrzwydzielniczy odpowiedzialny za prawidłowe trawienie i wchłanianie tłuszczowych, białkowych oraz węglowodanowych składników pokarmowych, a także jako narząd wewnątrzwydzielniczy produkujący przede wszystkim insulinę i glukagon związane z regulacją metabolizmu organicznego ustroju [1,2].

1. Regulacja zewnątrzwydzielniczej aktywności trzustki.

Produkcja i wydzielanie soku trzustkowego odbywa się w sposób ciągły. Wyróżnia się wydzielanie podstawowe i popokarmowe (trawienne), kiedy to ulega ono zwielokrotnieniu pod wpływem różnorodnych bodźców wydzielniczych. W dalszym ciągu trudno jest określić podstawową sekrecję u ludzi i zwierząt. Uważa się, że jest to wydzielanie zachodzące pomiędzy posiłkami przy braku czynników pobudzających. Jednakże u wielu gatunków nie ma ścisłej granicy pomiędzy końcem trzustkowej odpowiedzi na pokarm, a początkiem sekrecji podstawowej. U psów aktywność trzustki osiąga bowiem poziom podstawowy dopiero po 16-17 godzinach od posiłku [3,4]. Wydzielanie podstawowe jest prawdopodobnie efektem współdziałania wielu mechanizmów neurohormonalnych. Odbywa się ono dzięki ciągłej lub fazowej sekrecji, głównie gastryny, cholecystokininy (CCK), sekretyny, neurotensyny i motyliny w małych ilościach [5]. Ponadto związane jest prawdopodobnie z miejscowym uwalnianiem acetylocholiny i innych neurotransmiterów z zakończeń trzustkowych nerwów wydzielniczych. Atropina hamuje podstawową sekrecję enzymów zarówno przy zachowanych nerwach błędnych, jak również po wagotomii piennej z usunięciem zwojów kręgowych górnych i trzewnych co wskazuje na lokalną produkcję acetylocholiny w obrębie trzustki [6].

Kontrola sekrecji poposiłkowej, podobnie jak podstawowej, związana jest ze współdziałaniem wielu różnych czynników neurohormonalnych (ryc.1). Wydzielanie trzustkowe ulega wzrostowi już na początku posiłku pod wpływem zapachu, smaku, żucia i

CZYNNIKI NEUROHORMONALNE REGULUJĄCE ZEWNAĘTRZWARDZIELNICZĄ AKTYWNOŚĆ TRZUSTKI

HORMONY
JELITOWE

CZEŚĆ
WEWNAĘTRZ-
WYDZIELNICZA
TRZUSTKI

UKŁAD
NERWOWY

CZYNNIKI STYMULUJĄCE

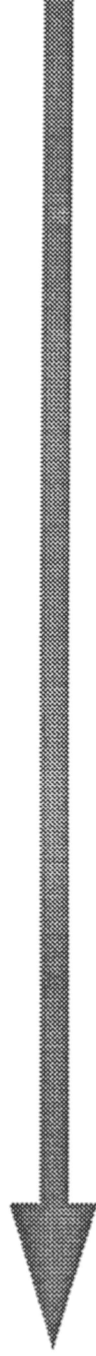
SEKRETYNA
CCK
NEUROTENZYNA
MOTYLINA

INSULINA

CHOLINERGICZNY
PEPTYDERGICZNY

* CCK
* VIP
* GRP

DOPAMINERGICZNY



CZYNNIKI HAMUJĄCE

SOMATOSTATYNA PP
PEPTYD YY

ADRENERGICZNY
PEPTYDERGICZNY
SOMATOSTATYNA
GLUKAGON

* NPY
* ENKEFALINY
* GALANINA
* CGRP

połykania spożywanego pokarmu. Od czasu doświadczeń Pawłowa na psach z rzekomym karmieniem zwiększona aktywność nerwów błędnych uważana jest za główny czynnik stymulujący wydzielanie trzustkowe w tej początkowej fazie. Zostało to potwierdzone przez szereg badań z użyciem atropiny, która w znaczącym stopniu redukuje wydzielanie trzustkowe pobudzone rzekomym karmieniem. Zwiększona produkcja i sekrecja enzymów trawiennych jest prawdopodobnie efektem nie tylko bezpośredniego pobudzenia komórek pęcherzykowych przez eferentne włókna wagalne, ale także odbywa się pośrednio poprzez cholinergicznie aktywowany wzrost wydzielania gastryny [2]. Trzustkowe włókna wagalne uwalniają obok klasycznego neurotransmitera, jakim jest acetylocholina, także inne substancje: VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), GRP (Gastrin Releasing Peptide), cholecystokininę, neurotensynę, NPY (Neuropeptide Y), substancję P, CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide), galaninę, enkefaliny [7-13]. Modyfikują one funkcje trzustki poprzez pobudzanie lub hamowanie sekrecji soku trzustkowego.

Wzrost aktywności eferentnych włókien nerwów błędnych, zaopatrujących trzustkę, jest nie tylko pochodzenia ośrodkowego, co ma miejsce w fazie głowowej, ale także związany jest z odruchami inicjowanymi w fazie żołądkowej i jelitowej [14]. Efektem rozciągania żołądka przez pokarm jest pobudzenie cholinergicznym, wago-wagalnym odruchów trzonowo-trzustkowych i odźwiernikowo-trzustkowych [15-18]. Inicjacja odruchu trzonowo-trzustkowego u psów poprzez rozciąganie żołądka balonem prowadzi do wzrostu

objętości soku sięgającego do 6% maksymalnej odpowiedzi na sekretynę i do wzrostu wyrzutu białek trzustkowych do 20% maksymalnej odpowiedzi na CCK [19]. Odruch antralno-trzustkowy jest prawdopodobnie obok gastryny głównym czynnikiem w fazie żołądkowej, gdyż wyrzut białka przez trzustkę, po rozciągnięciu antrum u psów może sięgać nawet do 50% maksymalnej reakcji na CCK, a wyrzut wodorowęglanów do 10% maksymalnej odpowiedzi na sekretynę [2]. Przyjmuje się, że około 50% wydzielania trzustkowego pobudzanego przez produkty trawienia białek i tłuszczów jest rezultatem działania wago-wagalnych odruchów jelitowo-trzustkowych, które nie tylko są odpowiedzialne za fazę jelitową ale są również uważane za mechanizm szybkiego uwalniania enzymów trawiennych w odpowiedzi na kwaśną treść żołądkową przechodzącą do dwunastnicy, gdy tymczasem mechanizm odpowiedzi późnej jest prawdopodobnie związany z uwalnianiem hormonów jelitowych [20-21]. Wynika to z rezultatów badań nad latencją odpowiedzi sekrecyjnej trzustki na stymulatory jelitowe. U psów latencja wydzielania amylazy po dodwunastniczym podaniu tryptofanu lub oleinianu była krótsza niż po podaniu CCK do żyły wrotnej. Atropina i wagotomia pienna wydłuża okres latencji wydzielania trzustkowego po tryptofanie czy oleinianie prawie 10-krotnie pozostając bez wpływu na latencję po CCK [22]. W odróżnieniu od tych wyników przypuszcza się, że wczesna sekrecja pod wpływem zakwaszenia dwunastnicy, przy dużym spadku pH jest raczej pochodzenia hormonalnego [2].

Obok nerwów cholinergicznym (błędnych) i nerwów

adrenergicznych (trzewnych), pewną rolę pełnią niecholinergiczne nieadrenergiczne nerwy autonomiczne, a ponadto hormony uwalniane z komórek błony śluzowej jelit pod wpływem kwaśnej treści żołądkowej i produktów trawienia składników pokarmowych w jelitach. Jednym z najsilniejszych bodźców jelitowych sekrecji enzymów trzustkowych są produkty trawienia tłuszczów. Długość łańcucha, rozpuszczalność oraz szybkość absorpcji są czynnikami determinującymi wielkość stymulacji trzustkowej przez produkty lipolityczne w świetle jelit. Wyrzut enzymów pod wpływem kwasów tłuszczowych osiąga wartość niewiele mniejszą od maksymalnej odpowiedzi na podanie egzogennej CCK, zaś wydzielanie wodorowęglanów sięga 60% maksymalnej sekrecji posekretynowej [23,24].

Innym stymulatorem trzustkowym są produkty trawienia białek. Peptydy i aminokwasy podane do jelit powodują sekrecję soku o małej objętości, ale bogatego w enzymy. Wykazano, że z 13 aminokwasów stymulujących sekrecję enzymów; tryptofan, fenyloalanina, lizyna i metionina wywołują największy stopień pobudzenia. W odróżnieniu od kwasów tłuszczowych odpowiedź trzustki na dojelitowe podanie aminokwasów jest mniejsza od maksymalnej reakcji na egzogenną CCK u ludzi i psów [25-27].

Zarówno kwasy tłuszczowe jak i aminokwasy wywierają działanie pobudzające na trzustkę poprzez uwalnianie hormonów jelitowych. Poziom cholecystokininy w osoczu wzrasta 5-10 razy powyżej wartości podstawowej u ludzi i zwierząt pod wpływem produktów rozpadu tłuszczów i białek. Natomiast sekretyna uwalniana jest w wyniku

spadku pH w dwunastnicy, obecności żółci i produktów trawienia tłuszczów. Poza tymi dwoma podstawowymi hormonami odpowiedzialnymi za fazę jelitową uwalniany jest szereg innych: neurotensyna, VIP, substancja P, bombezyna, motylina [2,28]. Stwierdzono, że pomiędzy cholecystokininą i sekretyną zachodzi zjawisko potęgowania działania czyli odpowiedź sekrecyjna na dwie równocześnie podane substancje jest większa niż suma efektów ich indywidualnego działania. O ile zachodzi potęgowanie wydzielania wodorowęglanów to prawdopodobnie ani u ludzi, ani u psów, nie dotyczy to wydzielania enzymów. Natomiast u szczurów i świnek morskich sekretyna oraz cholecystokinina potęgują się wzajemnie nie tylko przy wydzielaniu elektrolitów ale także i białek [2].

Pomiędzy kontrolą nerwową a hormonalną trzustki istnieje ścisły związek. Stymulujące działanie sekretyny i cholecystokininy ściśle zależy od cholinergicznego aktywacji trzustki. Szereg prac wykazało, że atropina podawana dożylnie silnie hamuje trzustkową sekrecję wodorowęglanów pobudzana sekretyną, jak również znosi współdziałanie pomiędzy sekretyną a cholecystokininą [29-31]. Ponadto stwierdzono, że wzrost wydzielania enzymów wywołany przez CCK-8 ulega w znacznym stopniu redukcji przez podaną atropinę [32]. Te obserwacje potwierdzają istnienie współzależności pomiędzy neurohormonalnymi układami kontrolującymi wydzielanie trzustkowe.

Rozpatrując czynniki modyfikujące zewnątrzwydzielniczą czynność trzustki należy wziąć pod uwagę także substancje wydzielane przez wyspy trzustkowe. Na podstawie eksperymentów

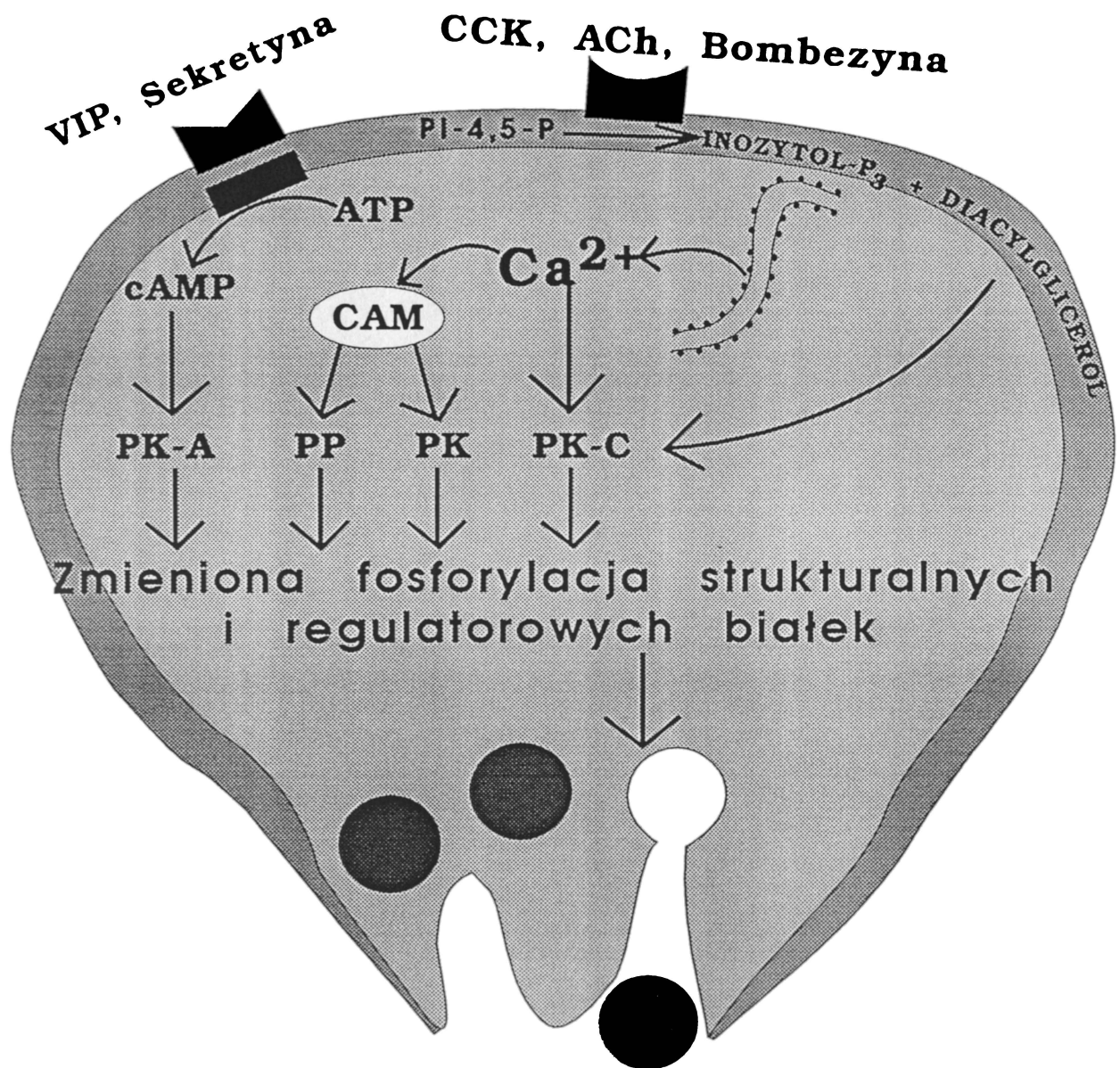
stwierdzono, że eliminacja insuliny, produktu komórek B, przez podanie specyficznych przeciwciał, wywołuje znaczne obniżenie sekrecji trzustkowej pobudzanej sekretyna, CCK-8 oraz pokarmem. Wynika z tego, że insulina wspomaga działanie bodźców stymulujących przy czym nie jest w pełni wyjaśniony mechanizm tego zjawiska. Sugeruje się, że efekt działania insuliny na zewnątrzwydzielniczą czynność trzustki zachodzi przynajmniej częściowo na drodze zahamowania lokalnego uwalniania somatostatyny będącej produktem komórek D wysp Langerhansa i hamującej na drodze parakrynej aktywność wydzielniczą trzustki [14]. Pozostałe hormony wydzielane przez komórki wyspowe: glukagon, polipeptyd trzustkowy (Pancreatic Polypeptide) wywierają głównie działanie hamujące na sekrecyjną aktywność komórek pęcherzykowych [28].

Głównymi składnikami wydzieliny trzustkowej są białka, elektrolity i woda. Zawartość białka w soku trzustkowym zależy od rodzaju bodźca wydzielniczego i często jest używana jako miernik aktywności enzymatycznej soku, ponieważ białko trzustkowe to w około 90% różne enzymy trawiące składniki pokarmowe. Produkcja enzymów odbywa się w szorstkiej siateczce endoplazmatycznej znajdującej się u podstawy komórek pęcherzykowych. Następnie nowo utworzone cząsteczki białka przemieszczają się w kierunku wierzchołka komórki do aparatu Golgiego. W jego wakuolach kondensacyjnych następuje dojrzewanie białka i przekształcanie w ziarna zymogenne. Proces uwalniania enzymów trzustkowych z ziarnistości zymogennych odbywa się na drodze egzocytozy

uruchamianej dzięki zmianom śródkomórkowym zachodzącym pod wpływem aktywacji receptorów błonowych przez czynniki neurohormonalne (ryc.2). Na podstawie badań nad izolowanymi komórkami pęcherzkowymi stwierdzono, że wszystkie czynniki stymulujące wydzielanie enzymów trzustkowych działają poprzez jeden z dwóch głównych typów receptorów i sprzężeń pobudzeniowo-wydzielniczych (stimulus-secretion coupling). Pierwszy typ receptorów pobudzają peptydy z rodziny gastrynowo-cholecystokininowej, peptydy bombezynopodobne, peptydy zbliżone strukturą do substancji P oraz acetylocholina, powodując wzrost uwalniania jonów wapnia z jego źródeł śródkomórkowych. Natomiast drugi typ receptorów pobudzają hormony: sekretyna i VIP, co aktywuje układ cykloazy adenylozylowa-cAMP. Pomimo, że każdy typ receptorów działa poprzez inny rodzaj przekaźników śródkomórkowych, to końcowy efekt ich pobudzenia jest ten sam, czyli wzrost uwalniania enzymów i elektrolitów do soku trzustkowego [28].

Enzymy trzustkowe można podzielić na trzy klasy: proteolityczne, lipolityczne, glikolityczne. Do grupy proteaz należy trypsyna, chymotrypsyna A i B, elastaza oraz karboksypeptydaza A i B. Ich cechą charakterystyczną jest to, że wydzielane są przez komórki pęcherzykowe w postaci nieaktywnych prekursorów, których aktywacja następuje dopiero w świetle jelit pod wpływem znajdującej się tam enterokinazy. Zapoczątkowany przez enterokinazę proces aktywacji przebiega następnie autokatalitycznie z udziałem czynnej już postaci trypsyny. Funkcja proteaz

WPLYW HORMONÓW NA PRZEMIANY WEWNĄTRZ-KOMÓRKOWE PROWADZĄCE DO POBUDZENIA WYDZIELANIA ENZYMÓW TRZUSTKOWYCH



PK-A - kinaza proteinowa
pobudzana przez cAMP
CAM - kalmodulina
PP - fosfataza proteinowa
PK - kinaza proteinowa

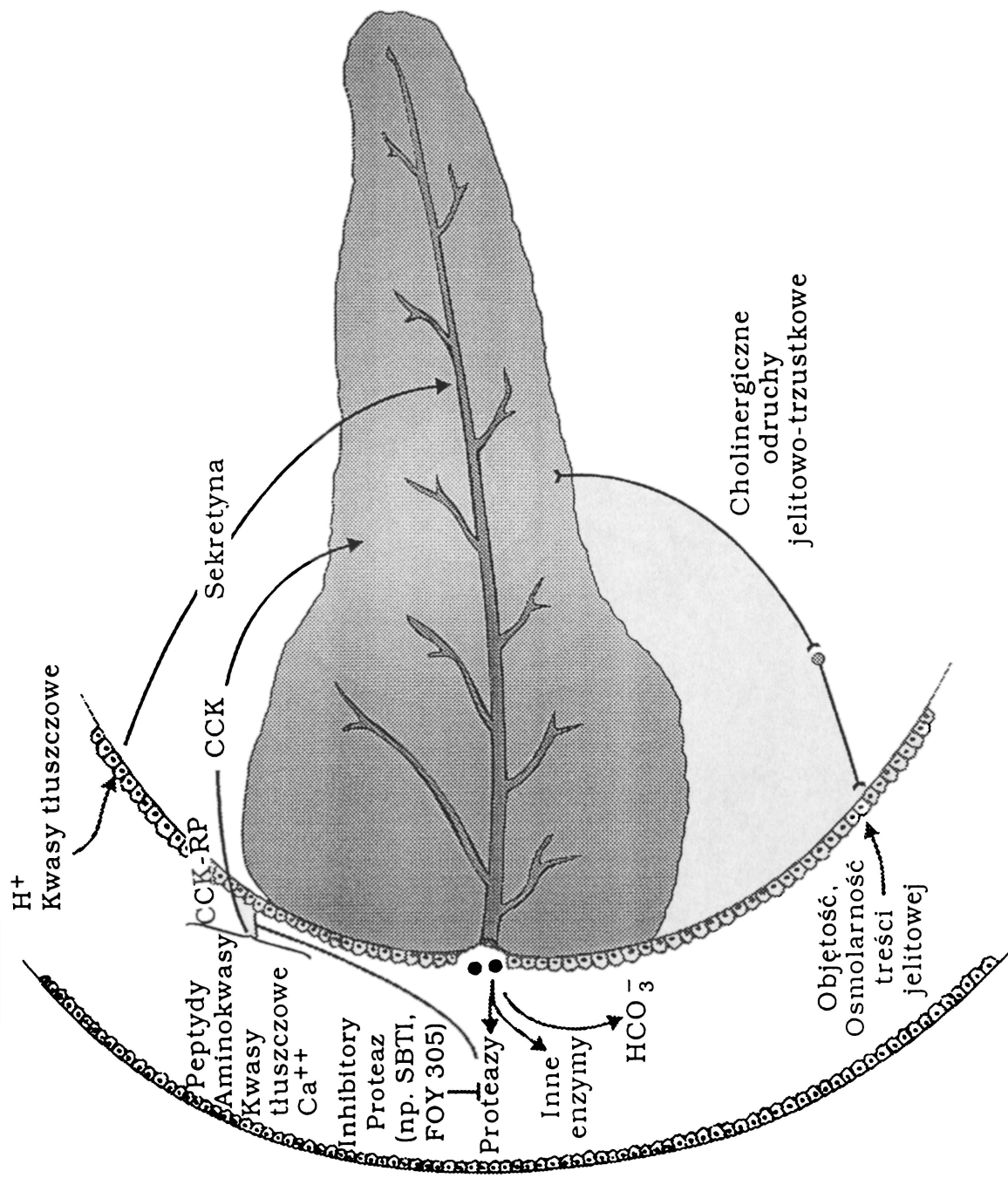
PK-C - kinaza proteinowa C
PI-4,5-P - 4,5-dwufosforan
fosfatydyloinozytolu
Inozytol P₃ - 1,4,5-trójfosforan
inozytolu

stanowiących 80% enzymów wydzielanych przez komórki pęcherzykowe trzustki jest hydrolityczny rozkład białka zawartego w pokarmie. W efekcie działania endopeptydaz trzustkowych następuje rozpad cząsteczek białkowych na fragmenty polipeptydowe, od których ulegają odłączeniu wolne aminokwasy pod wpływem egzopeptydaz soku trzustkowego i brzojka prażkowanego. Do kolejnej grupy enzymów wydzielanych w nieczynnej postaci należą enzymy lipolityczne: lipaza trzustkowa, fosfolipaza i esteraza, których zadaniem jest trawienie tłuszczowych składników pokarmowych. W odróżnieniu od proteaz i lipaz, enzym glikolityczny soku trzustkowego, alfa-amylaza uwalniana jest z komórek wydzielniczych w pełni aktywnej postaci. Amylaza trzustkowa hydrolizuje wewnętrzne wiązania alfa-1,4-glikozydowe skrobi i w przeciwieństwie do amylazy ślinowej hydrolizuje także surową, nie gotowaną skrobię rozpadającą się na maltozę, maltotriozę i alfa-dekstryny [28].

Enzymy trzustki poza funkcjami trawiennymi biorą również udział w kontroli jej zewnątrzwydzielniczych czynności. Pierwsze wstępne doniesienia na temat regulacyjnej roli proteaz pochodzą z 1972 roku od Greena i Lymanne [32]. Obecnie wiadomo, że u ludzi, szczurów i świń enzymy proteolityczne hamują sekrecję trzustkową zarówno w warunkach podstawowych jak i stymulowanych [33]. Natomiast u psów i świń morskich wydzielanie trzustki jest hamowane przez proteazy tylko w fazie jelitowej sekrecji stymulowanej [30]. Regulacja zewnątrzwydzielniczej aktywności trzustki przez proteazy na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego

wyduje się być dominującym mechanizmem kontrolnym u szczurów. Zaobserwowano, że podanie do jelit soku trzustkowego lub tylko trypsyny czy chymotrypsyny jest przyczyną znacznego spadku wydzielania trzustkowego. Natomiast wyprowadzenie soku trzustkowego na zewnątrz lub podanie do dwunastnicy inhibitora trypsyny np. Foy 305 powoduje wzrost wyrzutu enzymów i elektrolitów oraz stężenia cholecystokininy i sekretyny w osoczu. W uwalnianiu CCK i sekretyny u szczurów na skutek wyprowadzania soku trzustkowego na zewnątrz uczestniczą polipeptydy wydzielane przez błonę śluzową jelit. W przypadku CCK stwierdzono, że co najmniej dwie substancje związane są z uwalnianiem tego hormonu. Jedną z nich nazwano peptydem monitorującym (monitor-peptide) posiadającym strukturę podobną do trzustkowego inhibitora trypsyny i produkowanym przez trzustkę, a druga określana jako peptyd uwalniający CCK (CCK-releasing peptide = CCK-RP) wydzielana jest przez błonę śluzową dwunastnicy i pozostaje pod kontrolą cholinergiczną (ryc.3). U ludzi mechanizm ujemnego sprzężenia zwrotnego z udziałem proteaz trzustkowych nie jest w pełni wyjaśniony. Trypsyna podana do dwunastnicy obniża wyrzut białek i poziom CCK w osoczu lecz zahamowanie proteaz wywołujące zwiększoną sekrecję trzustkową nie jest połączone ze wzrostem osoczym CCK. W związku z tym przypuszcza się, że mechanizm ten nie zależy od CCK. Wskazuje nato także fakt, że preparat loxiglumid (bloker receptorów A dla CCK) u ludzi nie powoduje zmniejszenia wydzielania stymulowanego wyprowadzaniem soku, natomiast zjawisko to występuje po atropinie. Sugeruje to, że

REGULACJA ZEWNĄTRZYZIELNICZEJ AKTYWNOŚCI TRZUSTKI



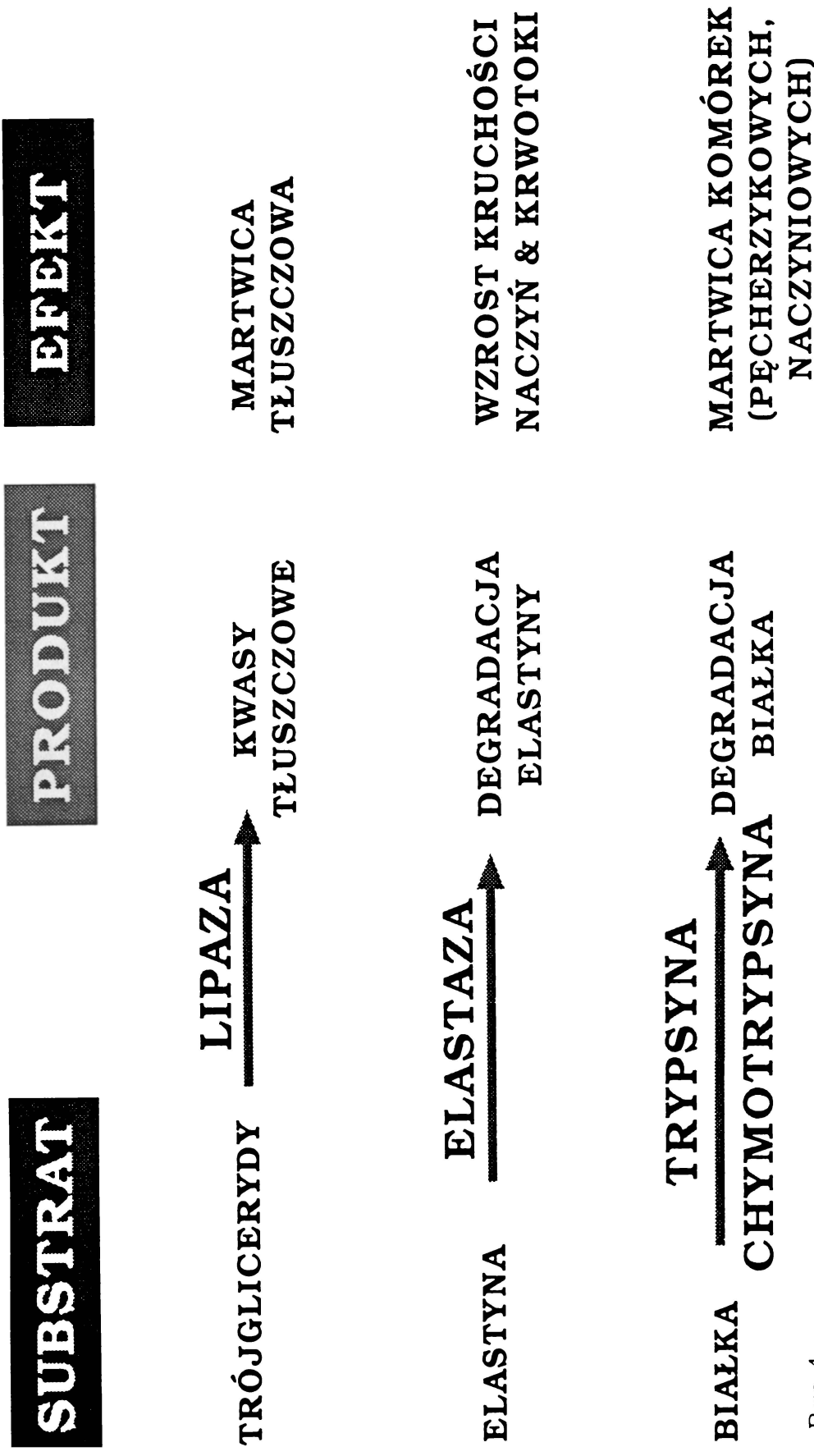
regulacyjne działanie proteaz u ludzi jest związane z mechanizmem cholinergicznym [34-39].

2. Patogeneza ostrego zapalenia trzustki.

Wysoka aktywność różnych enzymów produkowanych przez trzustkę stworzyła konieczność zaistnienia mechanizmów chroniących narząd przed autodestrukcją. Jedną z barier stanowi, wspomniane już zjawisko oddzielnego syntetyzowania, magazynowania i wydzielania enzymów w postaci nieaktywnych prekursorów, które przechodzą w formy czynne dopiero w świetle jelit. Ziarna zymogenów, w postaci których spichrzane są enzymy trzustkowe, rozdzielają wewnątrz komórek błony lipoproteinowe. Ponadto zarówno sok trzustkowy jak i sama tkanka trzustkowa zawierają inhibitor polipeptydowy tworzący z aktywną trypsyną nieczynny kompleks co zapobiega wewnątrzkomórkowej aktywacji enzymów trawiennych. Ten inhibitor nie unieczynnia jednak w pełni trypsyny stąd pozostają śladowe ilości jej aktywnej postaci w tkance trzustkowej. Przełamanie mechanizmów ochronnych prowadzi do uszkodzenia komórek zewnątrzwydzielniczych i do następowego rozwoju stanu zapalnego [28]. Powstanie zmian patologicznych jest wynikiem uruchomienia śródtrzustkowej kaskady reakcji enzymatycznych (ryc.4).

Istnieje szereg czynników prowadzących do powstania stanu zapalnego w trzustce. Spośród nich należy przede wszystkim wymienić choroby dróg żółciowych (głównie kamice żółciową), zmiany w obrębie przewodów trzustkowych, czynniki toksyczne (alkohol, leki), zmiany naczyniowe i inne [28]. W warunkach doświadczalnych zapalenie

LOKALNE ZMIANY POWSTAJĄCE W TRAKCIE ZAPALENIA TRZUSTKI



trzustki wywołuje się wykorzystując różnorodne modele stwarzające możliwość prowadzenia badań, które mają na celu wyjaśnienie genezy zmian patologicznych.

Hiperstymulacja hormonalna typu CCK (np. ceruleina lub sama CCK) prowadzi do rozwoju zapalenia trzustki charakteryzującego się masywnym obrzękiem i śródmiąższowym odczynem zapalnym. Zmiany rozwijają się szybko osiągając maksymalne nasilenie pomiędzy 3-6 godziną infuzji hormonu. Po kilku dniach od momentu powstania zmian zapalnych rozpoczyna się proces regeneracji trzustki [2,40-43].

Stan zapalny trzustki można wywołać u myszy podając im dietę ubogą w cholinę i uzupełnioną 0.5% DL-etioniną. Rozwija się wówczas krwotoczna martwica tkanki trzustkowej, której towarzyszy 100% śmiertelność po około czterech dniach od powstania uszkodzeń. Współczynnik śmiertelności zależy od zawartości DL-etioniny w pokarmie i od czasu trwania diety [44-46].

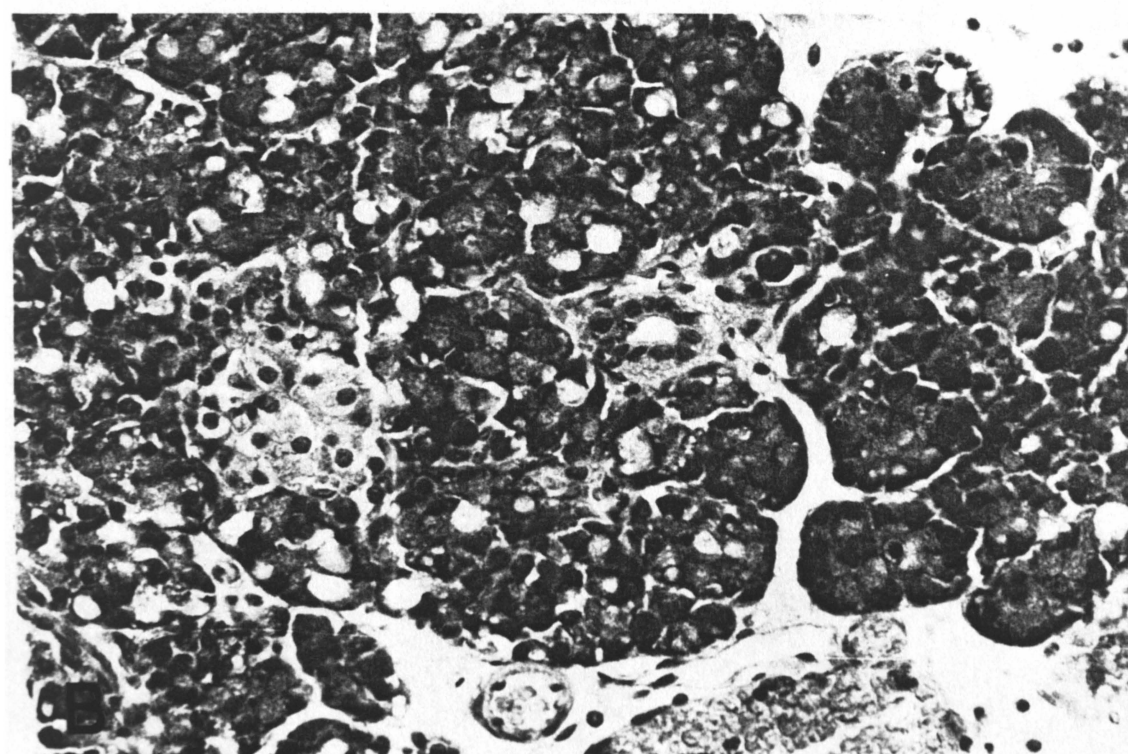
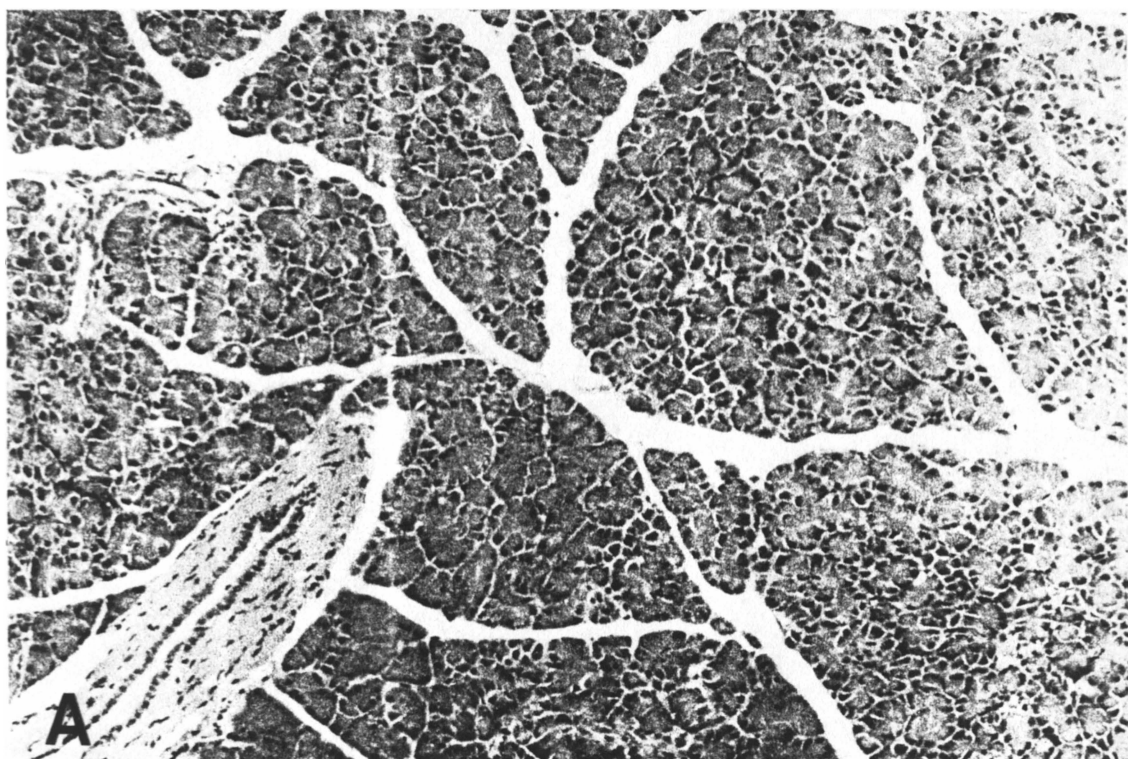
Infuzja 5% taurocholanu sodowego do wspólnego przewodu trzustkowo-żółciowego u szczurów prowadzi także do szybko rozwijającej się krwotocznej martwicy trzustki. Po 6 godzinach od zakończenia infuzji ogniska martwicy zajmują 5,7% powierzchni trzustki, a po 24 godzinach stanowią około 29.5% powierzchni. Prawie 100% zwierząt ginie w ciągu 36 godzin od podaniu taurocholanu sodowego [47].

Podwiązanie przewodu wspólnego trzustkowo-żółciowego u większości zwierząt prowadzi do obrzęku trzustki z niewielkim odczynem zapalnym. Po kilku dniach lub tygodniach od podwiązania przewodu

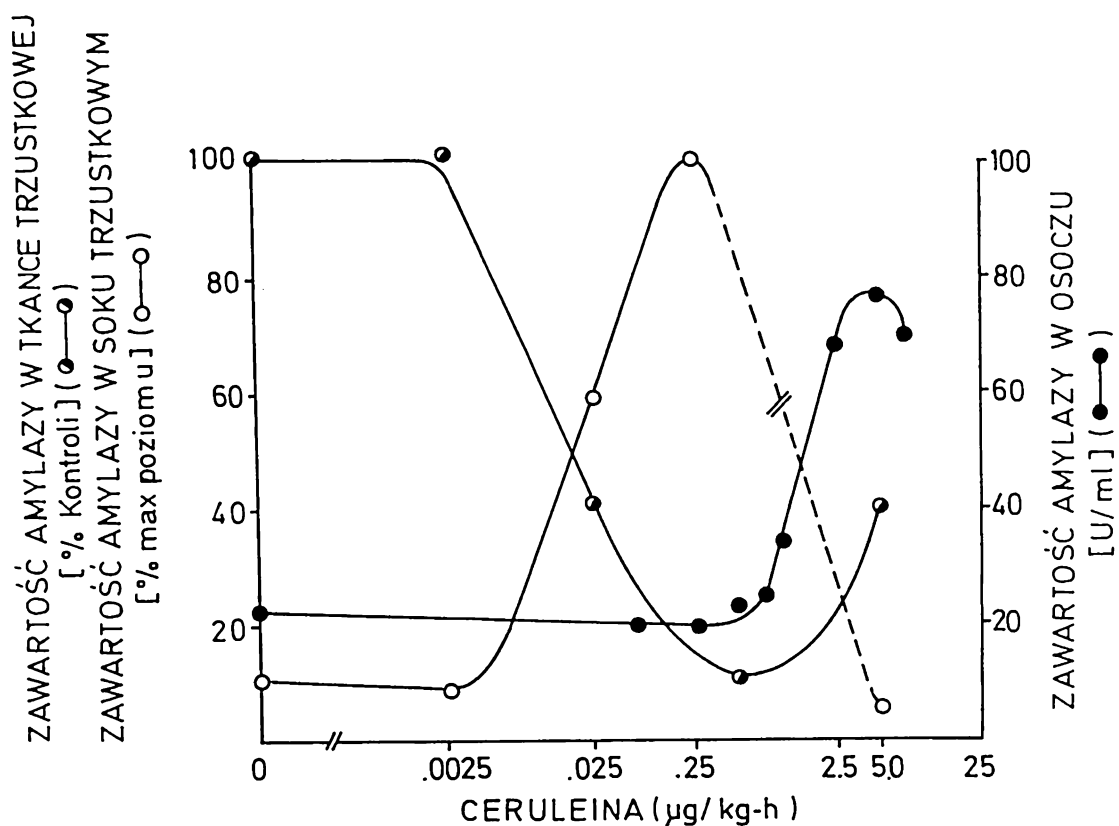
następuje atrofia tkanki gruczołowej trzustki [48].

Poza wymienionymi, najczęściej stosowanymi, modelami wywoływania zapalenia trzustki zmiany patologiczne można otrzymać przez zaburzenie prawidłowego mikrokrażenia trzustkowego stosując polistyrenowe mikrosfery [49], podając wysokie dawki aminokwasów np. lizyny [50] oraz przez wykorzystanie szeregu innych metod.

W moich badaniach posłużyłam się modelem polegającym na wywoływaniu uszkodzeń pięciogodzinna, podskórna infuzją ceruleiny w dawce 10 $\mu\text{g/kg/h}$. Ceruleina będąca strukturalnym analogiem CCK, jest deka-peptydem, którego C-końcowy oktapeptyd jest identyczny z C-końcem endogennej cholecystokininy z tą różnicą, że zamiast metioniny w pozycji 6 znajduje się treonina. Ceruleina wykazuje pełny zakres działania biologicznego CCK [43,51]. Konsekwencja hiperstymulacji ceruleinowej jest zmniejszona sekrecja enzymów przez komórki pęcherzykowe do światła przewodu trzustkowego oraz uwalnianie ich do podścieliska trzustki. Jedną z najwcześniej rozwijających się zmian jest obrzęk śródmiażdżowy będący rezultatem dysfunkcji łożyska mikrokrażenia i zwiększonego przechodzenia białka do przestrzeni okołokomórkowej. W obrębie ognisk zapalnych pojawiają się neutrofile osiagające szczyt pod względem liczebności pomiędzy 6 a 12 godziną po zadziałaniu bodźca uszkadzającego (ryc.5). Fibroblasty i makrofagi obecne w tkance trzustkowej stają się dominującym typem komórek zapalnych około 3 dnia [33]. Poza tym, podobnie jak podczas rozwoju zmian zapalnych w trzustce u ludzi, w modelu doświadczalnym dochodzi do wczesnego wzrostu stężenia enzymów trawiennych w osoczu [33] (ryc.6).



Ryc.5 Mikroskopowy obraz: (A)-prawidłowego mięszu trzustki, (B)-ceruleinowego zapalenia trzustki (widoczna wakuolizacja komórek zrazikowych oraz okołonaczyniowy naciek zapalny)



Ryc.6. Dawko-zależny wpływ stymulacji ceruleinowej na zawartość enzymów w tkance trzustkowej, soku trzustkowym i w osoczu. (Wg. G. Scheele i G. Adler, 1987).

Do czynników odpowiedzialnych za zapoczątkowanie i rozwój uszkodzeń w przebiegu zapalenia trzustki prawdopodobnie należą:

- zahamowanie prawidłowego transportu białek wydzielniczych;
- zmiany w segregacji białek trzustkowych w komórkach pęcherzykowych;
- aktywacja enzymów trawiennych w tkance trzustkowej.

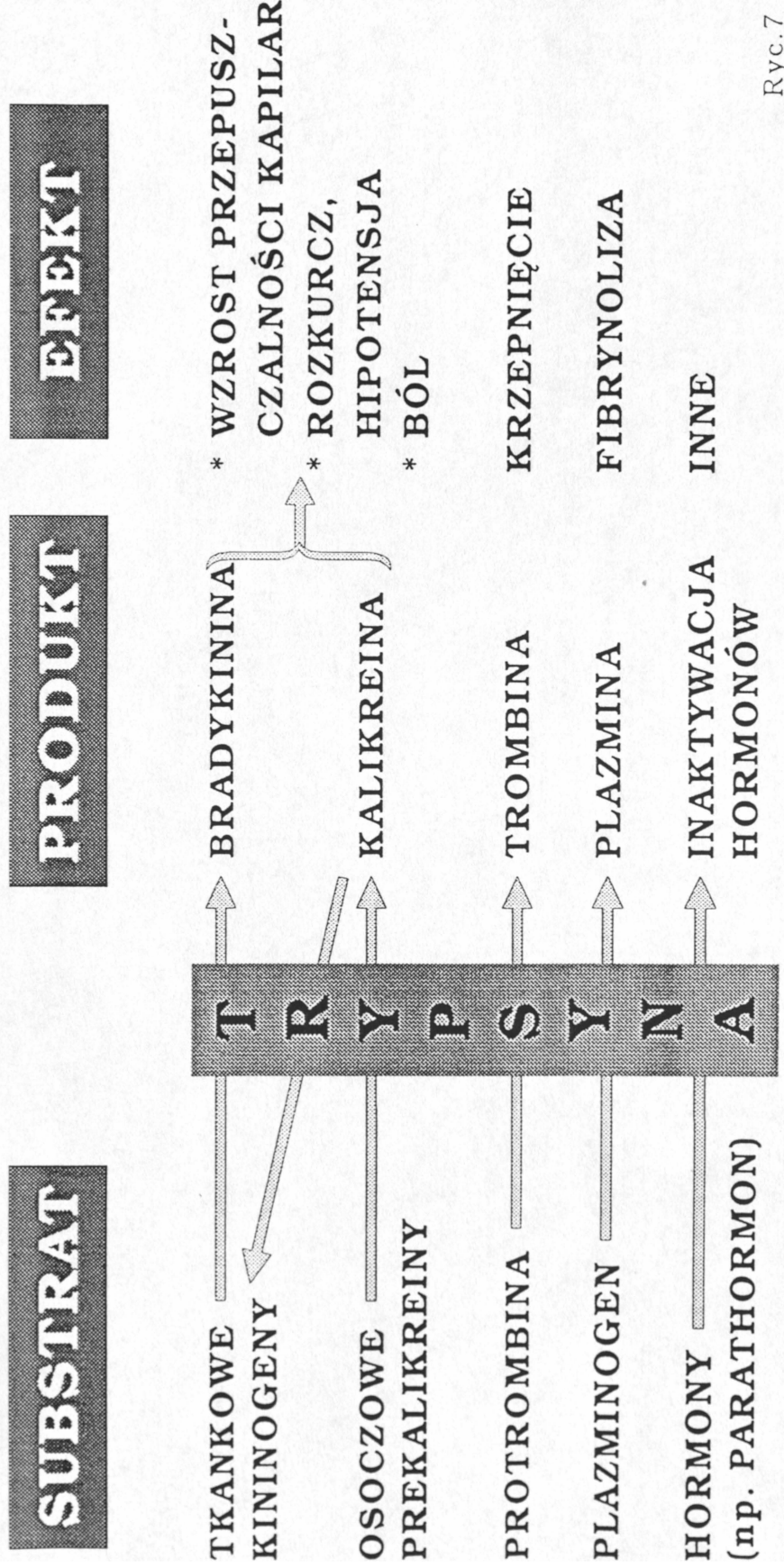
W warunkach prawidłowych zymogeny trzustkowe ulegają przemieszczeniu w obrębie komórki poprzez szereg błon lipoproteinowych oddzielających przedziały śródkomórkowe zanim zostaną ostatecznie zmagazynowane w granulach sekrecyjnych przeznaczonych do egzocytozy. Czynniki odpowiedzialne za kierowanie ziarnistości zymogennych ku wierzchołkowi komórek pęcherzykowych oraz czynniki wymagane do fuzji błon w czasie egzocytozy są nieznane. Redukcja egzocytozy w wierzchołkowej części komórek trzustkowych jest prawdopodobnie przyczyną spadku sekrecji enzymów do przewodu wyprowadzającego w czasie zapalenia, przy czym mechanizm prowadzący do zmniejszenia egzocytozy pozostaje wciąż niewyjaśniony [33]. Pęcherzyki trzustkowe otrzymane od szczurów z ceruleinowym zapaleniem trzustki wykazują zmniejszoną reakcję na neurohormonalną stymulację oraz stwierdzono w nich zmniejszoną akumulację zymogenu. Steer [33] sugeruje, że spadek odpowiedzi komórkowej występujący po hiperstymulacji może być przynajmniej w części związany z defektem wiązania stymulatorów sekrecyjnych. Innym czynnikiem, który wydaje się być istotnym w zahamowaniu wydzielania białka do przewodu trzustkowego jest szkielet aktynowy w szczytowej części komórek ulegający dezorganizacji w wyniku hiperstymulacji [33].

Przekształcanie struktur śródkomórkowych otoczonych błonami lipoproteinowymi w degradacyjne struktury odbywa się w procesach fizjologicznych i patologicznych. Najczęstszą postacią tego typu zmian jest autofagia, kiedy cytozol i organelła ulegają

przekształceniu w wakuole autofagiczne a następnie fuzji z obecnymi w komórce lizosomami. Autofagiczne wakuole zlokalizowane są zwykle w środkowej i podstawnej części komórek. Ziarnistości zymogenne znalezione w tych strukturach posiadają zwykle błonę, która nie ulega degradacji. Autofagia wykorzystywana jest do odzysku śródkomórkowych komponent błonowych przy czym może zachodzić pod wpływem czynników fizjologicznych np. neurohormonalnej stymulacji lub może być odpowiedzią na uszkodzenie. Komórki pęcherzykowe od zdrowych szczurów kontrolnych oraz od tych, które otrzymały niską dawkę ceruleiny (0.25 ug/kg/h przez 3 godz) zawierały minimalną ilość wakuoli autofagicznych. Maksymalna 12 godzinna stymulacja ceruleiną znacznie zwiększyła ilość wakuoli, natomiast hiperstymulacja w znaczący sposób zwielokrotniła i znacznie przyspieszyła tworzenie tych struktur [33]. Drugim rodzajem fuzji śródkomórkowej jest krynofagia zachodząca pomiędzy ziarnistościami zymogenów a lizosomami przy czym błony tych ziarnistości ulegają destrukcji.

Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za wewnątrzkomórkową aktywację enzymów trzustkowych są enzymy lizosomalne a przede wszystkim katepsyna B. Jest to tiolowa proteaza, która może katalizować konwersję trypsynogenu do trypsyny wskutek czego następuje prawdopodobnie inicjacja proteolitycznej kaskady wewnątrz komórek pęcherzykowych [33] (ryc.7). Konsekwencją tych wszystkich zmian powstających w obrębie cytozolu jest zaburzenie prawidłowej wierzchołkowej dystrybucji zymogenu, patologiczna fuzja błon,

LOKALNE I OGÓLNOUSTROJOWE EFEKTY POZAJELITOWEJ AKTYWACJI TRYPSYNY POWSTAJĄCE W TRAKCIE ZAPALENIA TRZUSTKI



boczno-przypodstawna egzocytoza prowadząca do uwalniania aktywnych enzymów trawiennych do przestrzeni międzykomórkowej i w efekcie destrukcja mięszu trzustki.

Patologicznym zmianom rozwijającym się w obrębie zrazików trzustkowych towarzyszy niedokrwienie narządu. Wykazano, że istnieje ścisły związek pomiędzy spadkiem przepływu krwi a pogłębianiem się procesu chorobowego, chociaż nie stwierdzono czy zmiany w krążeniu trzustkowym są powodem czy też skutkiem zmian zapalnych. Na podstawie badań można wnioskować, że spadek przepływu krwi przez trzustkę nie wywołuje jeszcze uszkodzenia tego narządu ale mu towarzyszy [52-60]. Ponadto stwierdzono, że zmiany w wielkości przepływu krwi przez trzustkę odgrywają bardzo ważną rolę w regulacji jej aktywności sekrecyjnej [61-65]. Trzustkowy przepływ ulega zwiększeniu w przypadku pobudzenia wydzielniczego co stanowi fizjologiczną odpowiedź na wzrost zapotrzebowania na tlen i metabolity w wyniku stymulacji trzustki [52,63,64,66].

3. Biosynteza oraz własności tlenku azotu.

Poprzednie badania wykazały, że przekrwienie czynnościowe trzustki oraz niedokrwienie w przebiegu procesu zapalnego są częściowo związane z biosyntezą tlenku azotu (NO), zaliczanego do nowej grupy śródbłonkowych mediatorów biologicznych. Zdolność do syntezy i uwalniania tlenku azotu wykazuje szereg różnego typu komórek, które dzięki temu posiadają możliwość modyfikowania przemian metabolicznych zachodzących w ich sąsiedztwie.

Badania dotyczące NO prowadzone były niezależnie od siebie z wykorzystaniem rozmaitych układów biologicznych. W 1980 roku Furchgott i Zawadzki wykazali, że naczynia krwionośne tracą zdolność rozkurczu pod wpływem acetylocholiny po usunięciu z nich śródbłonna. Ponadto stwierdzili, że acetylocholina poprzez działanie na receptory komórek śródbłonna uwalnia z nich małocząsteczkową substancję, która dyfunduje przez błony do komórek mięśni gładkich naczyń wywołując ich rozkurcz. Substancja ta została nazwana EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factor) i dopiero w 1987 roku wykazano, że skutki jej działania i własności są identyczne z cechami charakteryzującymi tlenek azotu [67-70].

Hibbs, Marleta wykazali, że makrofagi tracą zdolność niszczenia komórek nowotworowych i drobnoustrojów gdy z ich środowiska zostanie usunięta L-arginina wykorzystywana przez nie do produkcji NO, który jak się okazało jest mediatorem ich cytotoksycznych własności [68]. Hibbs zidentyfikował po raz pierwszy bloker enzymu syntezującego NO. Pochodne L-argininy a zwłaszcza jej metylowe analogi skutecznie blokują aktywność syntazy tlenu azotu (NOS) i tym samym pozbawiają makrofagi zdolności niszczenia obcych komórek [68].

Makrofagi i komórki śródbłonna nie są jedynymi miejscami, w których odbywa się produkcja NO. Obecność syntazy NO wykazano w ośrodkowym układzie nerwowym, zwłaszcza w neuronach mózdkowych, które uwalniały czynnik o własnościach NO oraz na stwierdzeniu takiego czynnika w wyciągach mózgowych. Aktualnie

wiadomo, że aktywność enzymu syntezującego NO posiadają różnorodne populacje neuronów mózgowych. W niektórych obszarach mózgu obecność NOS wykazują wszystkie neurony, zaś w innych stanowią tylko 1-2% danej grupy neuronów np. w korze mózgowej, hipokampie. Nadal nie jest sprecyzowana funkcja NO w układzie nerwowym. Przypuszcza się, że pełni rolę mediatora w neurotoksycznych procesach zachodzących podczas udaru mózgowego. Niszczy neurony działając na nie bezpośrednio lub poprzez udział w tworzeniu substancji o znacznie wyższej niż on sam toksyczności. Ponadto NO jest prawdopodobnie związany ze zmianami przewodnictwa synaptycznego leżącego u podstaw procesów uczenia i zapamiętywania [68,71].

Uwalnianie tlenu azotu stwierdzono nie tylko w neuronach ośrodkowego układu nerwowego, ale także w neuronach obwodowych, z zakończeń włókien niecholinergicznego nieadrenergicznego układu nerwowego (NANC). Razem z wcześniej poznanymi neurotransmiterami NANC; VIP i ATP, NO jest odpowiedzialny za rozkurcz mięśni gładkich przewodu pokarmowego. Wydaje się to potwierdzać fakt, że stosując blokery syntazy NO można zmniejszyć w znacznym stopniu efekt stymulacji prądem elektrycznym włókien NANC lub efekt działania VIP czy ATP[72-73].

Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że NO razem z prostanoidami odpowiedzialny jest za regulację żołądkowego przepływu krwi i utrzymanie integralności błony śluzowej żołądka. Wynika to ze stwierdzenia obecności konstytutywnej postaci iNOS w homogenatach błony śluzowej żołądka, jak również z tego, że

zastosowanie inhibitorów syntazy NO prowadzi do pogłębienia uszkodzeń wywołanych działaniem etanolu lub indometacyny. Efekt ten można odwrócić stosując L-argininę, aminokwas będący substratem w produkcji NO lub egzogenne donory NO, np. nitroprusydek sodowy czy nitroglicerynę. Ponadto okazało się, że gastroprotektoryjne działanie leków: sukralfatu, leków alkalinizujących zawierających aluminium także związane jest z aktywacją syntazy NO. Sugeruje się również, że NO związany jest nie tylko z gastroprotekcją ale i z procesami gojenia przewlekłych wrzodów żołądka ponieważ po podaniu L-argininy substratu NO lub nitrogliceryny, donora NO, zaobserwowano zwiększony przepływ krwi w obrzeżu wrzodowym oraz zwiększoną angiogenezę w ziarninie pokrywającej uszkodzenia [74-77].

Kolejne doniesienia dostarczają coraz więcej informacji na temat miejsc syntezy NO i udziału tego gazu w procesach fizjologicznych. Produkcja NO w płytkach zmniejsza ich zdolności do adhezji i agregacji [78-79], zaś obecność NO, w hepatocytach związana jest z jego udziałem w regulacji syntezy białka wątrobowego [73].

Komórki wysp trzustkowych B i A zawierają prawdopodobnie obie postaci syntazy NO konstytutywną i indukowalną. Działanie interleukiny-1 B (Il-1 B) powoduje aktywację indukowalnej syntazy NO i produkcję dużych ilości NO. Pełni on funkcję molekularnego efektora , dzięki któremu Il-1 B hamuje wydzielanie insuliny. Ponadto stwierdzono , że L-arginina potęguje wydzielanie insuliny pobudzane D-glukoza. W dalszym ciągu jak widać istnieje wiele

kontrowersji co do tego jaką rolę NO pełni w procesach związanych z uwalnianiem insuliny. Prawdopodobnie w zależności od koncentracji i czasu trwania jego produkcji wywiera zarówno efekty fizjologiczne jak i patologiczne w obrębie wysp trzustkowych [80-81].

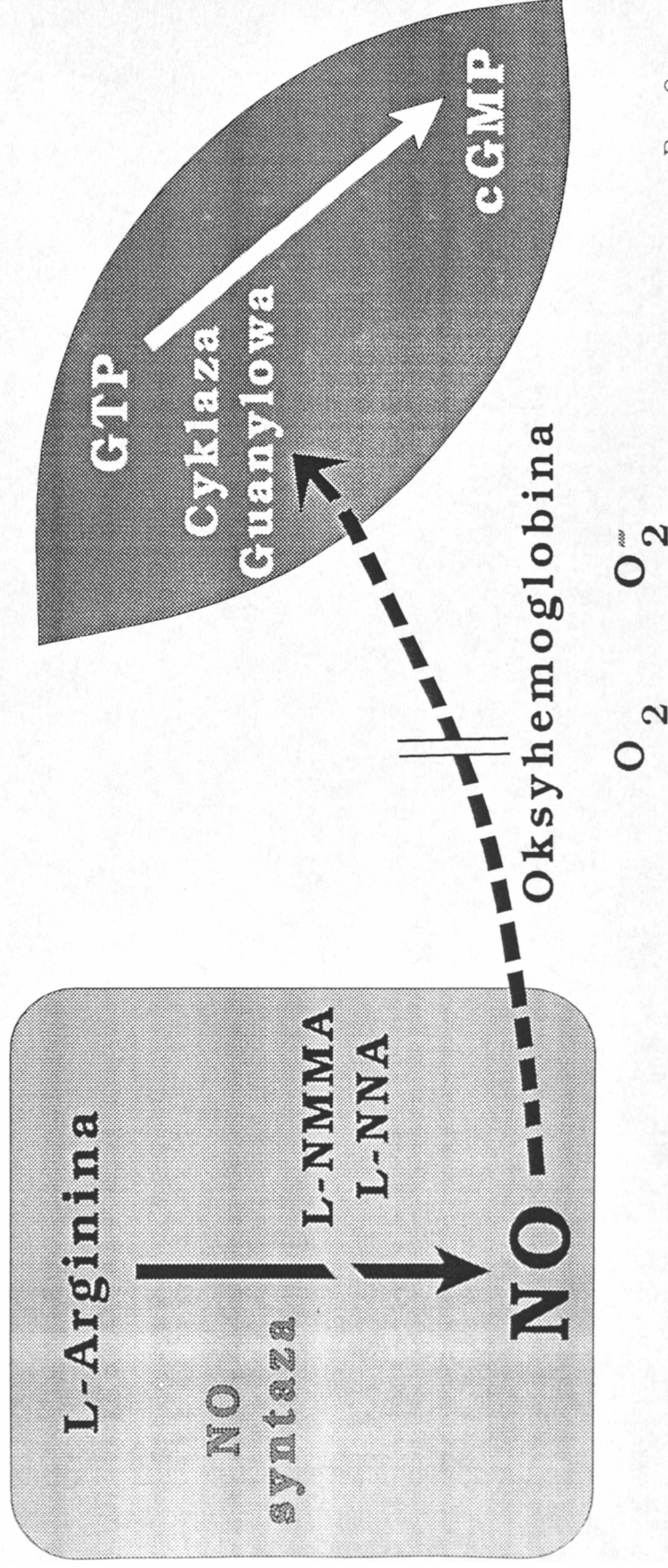
Szereg innych miejsc: nadnercza, nerki itd wykazuje aktywność syntazy NO ale funkcja NO w tych tkankach jest w dalszym ciągu nie w pełni wyjaśniona [73].

Wszystkie poznane do tej pory mediatory biologiczne posiadają zupełnie odmienne własności niż te, które charakteryzują NO, będący gazem o nieznacznej zdolności do rozpuszczania w wodzie. Jego półokres rozpadu jest krótszy od 5 sekund (w roztworach wynosi około 10 sekund) z powodu szybko następującego utlenienia do nieorganicznych nitrytów i nitratów [82-84] (ryc.8). NO jest niszczone również przez aniony nadtlenkowe stąd też ich wymiatacz - dysmutaza nadtlenkowa w znacznym stopniu wydłuża okres jego aktywności biologicznej [69,70,85]. NO wykazuje dużą zdolność do łączenia się z oksyhemoglobina i innymi białkami zawierającymi hem [69,70,85]. Dzięki cechującej go lipofilności posiada ogromną zdolność do dyfundowania przez błony komórkowe [85]. W ten sposób przedostaje się z miejsca syntezy np. z komórek śródbłonna naczyniowego do miejsca swojego działania w tym wypadku do cytoplazmy sąsiadujących komórek mięśni gładkich naczyń, gdzie pobudza aktywność cyklazy guanylowej, białka zawierającego hem (ryc.9). Dzięki wysokiemu powinowactwu NO do żelaza z grupy hemowej następuje zmiana konformacji cyklazy guanylowej prowadząca do

INAKTYWACJA NO: HbO_2 , O_2 & O_2^-

Komórka
Śródbłonna
Naczyniowego

Komórka docelowa

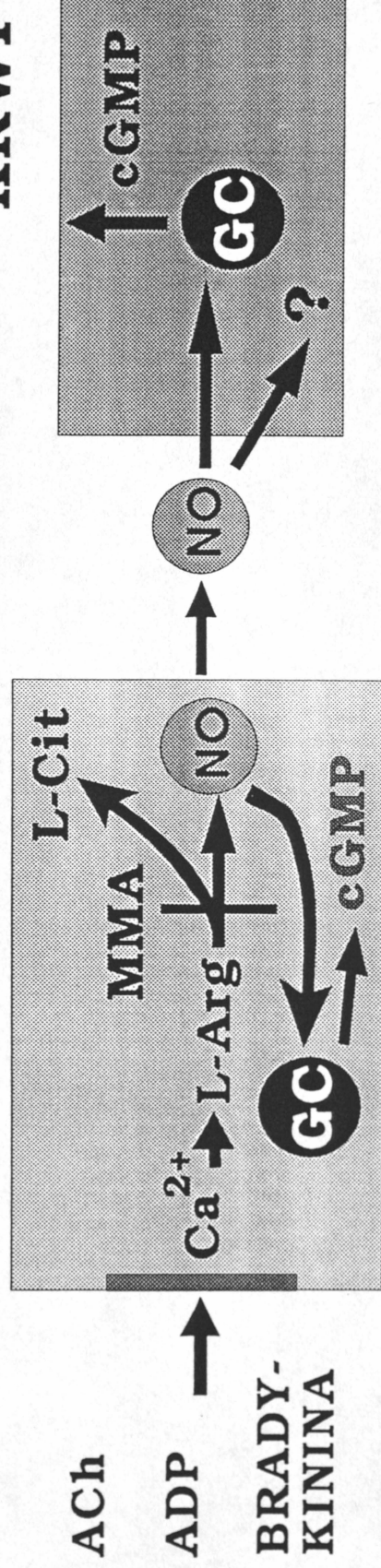


MECHANIZM DZIAŁANIA I UWALNIANIA TLENKU AZOTU

**MIEŚNIE
GŁADKIE
NACZYŃ
I PŁYTKI
KRWI**

**CZYNNIKI
STYMULUJĄCE**

**KOMÓRKA ŚRÓDBŁONKA
NACZYNIOWEGO**



**KOMÓRKA
EFEKTOROWA**

**KOMÓRKA
DOCELOWA**

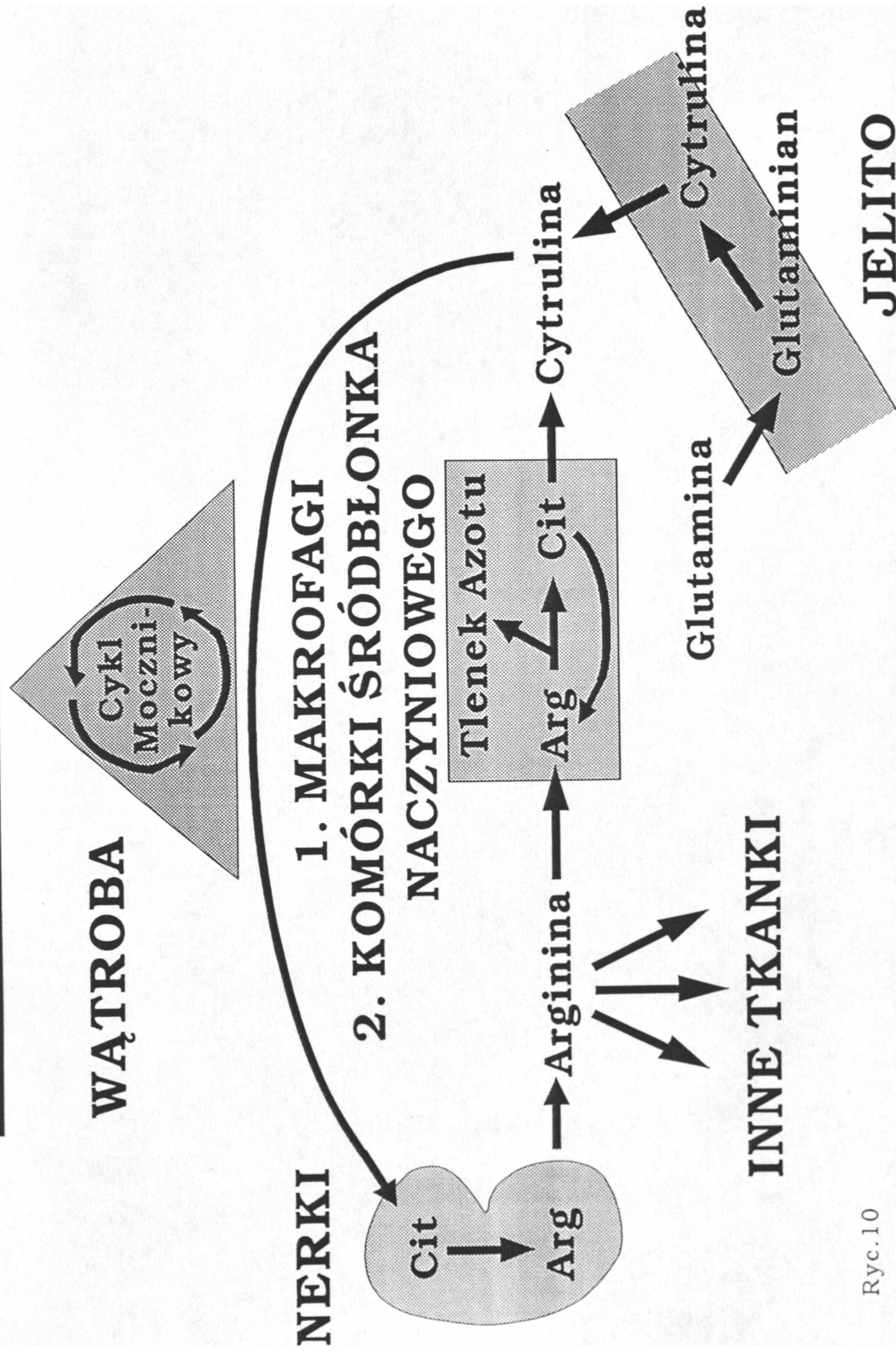
Ryc.9

wzrostu jej aktywności enzymatycznej. Następstwem tego jest zwiększenie syntezy cGMP z GTP, co z kolei stymuluje fosforylację białka przez kinazę białkową zależną od cGMP. Konsekwencją tych zmian jest rozkurcz mięśni gładkich naczyń i wzrost przepływu krwi [71,73].

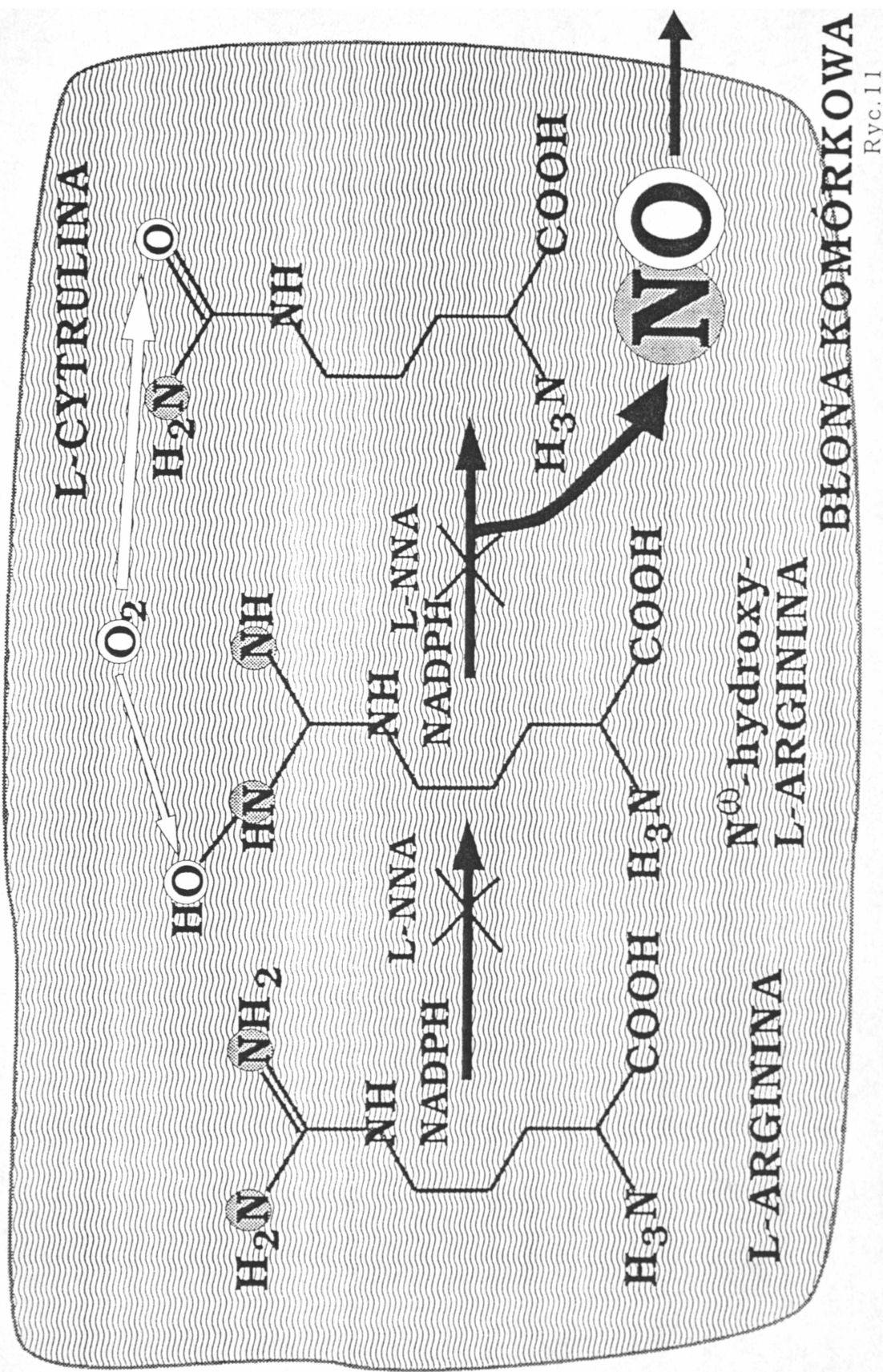
Substratem wykorzystywanym do produkcji tlenu azotu jest L-arginina, aminokwas syntezowany przez komórki, ale nie zawsze w ilości pokrywającej ich zapotrzebowanie, stąd określa się go jako aminokwas półpodstawowy. L-arginina uczestniczy w różnorodnych cyklach biochemicznych zachodzących w żywym organizmie (ryc.10, 11). Poza cyklem mocznikowym w wątrobie, L-arginina jest niezbędna do produkcji kreatyny i poliamin. Synteza L-argininy przede wszystkim jest związana z obrotem substancji pomiędzy jelitami a nerkami. Cytrulinę powstająca w nabłonku jelitowym z glutaminy krew transportuje do nerek, gdzie ulega ona konwersji do L-argininy, która zostaje następnie wykorzystana przez inne tkanki. Prawdopodobnie cytrulina będąca obok NO efektem działania NOS może być wykorzystywana do odtwarzania substratu co zapewniałoby stały śródkomórkowy poziom L-argininy. Vane wykazał, że komórki śródbłonkowe aorty są zdolne do konwersji cytruliny do L-argininy a inni stwierdzili, że proces ten może zachodzić także w makrofagach [86].

W związku z tym, że NO jest bardzo nietrwałą substancją wiele jego własności poznano dzięki badaniom enzymu niezbędnego do jego produkcji. NOS występuje w postaci wielu izoform, z których

ENDOGENNA SYNTEZA ARGININY



SYNTEZA TLENKU AZOTU



tylko trzy zostały do tej pory oczyszczone. Wszystkie izoformy wykorzystują L-argininę jako podstawowy substrat w produkcji NO oraz wszystkie ulegają zablokowaniu przez nitro-analogi L-argininy. Pod względem strukturalnym postaci syntazy NO również są podobne, gdyż każda jest flawoproteina zawierająca FAD i FMN, ponadto ich aktywność jest zależna od obecności NADPH i 5.6.7.8-tetrahydrobiopteryny (BH₄). W makrofagach wykazano obecność NOS indukowalnej (izoforma II) rozpoczynającej swoją enzymatyczną działalność dopiero po pojawieniu się czynnika stymulującego, którym mogą być: interferon gamma, TNF, interleukina-1 i lipopolisacharydy bakteryjne. Produkuje duże ilości NO przez wiele godzin po jednorazowej aktywacji nie wymagając ciągłej obecności czynników pobudzających. Ten typ enzymu stwierdzono również w hepatocytach a nawet ślad w komórkach śródbłónka naczyniowego. Izoformy I i III określane są jako enzymy konstytutywne, które wykazują ciągłą aktywność niezależnie od czynników inicjujących. W odróżnieniu od syntazy indukowalnej wymagają obecności kalmoduliny i jonów wapnia do uzyskania pełnej aktywności enzymatycznej. W neuronach mózgowych i mózdkowych stwierdzono izoformę I. Podobnie na podstawie badań immunohistochemicznych w zakończeniach nerwowych NANC wykazano obecność izoformy I lub postaci bardzo do niej zbliżonej. Izoforma III, konstytutywna zależna od kalmoduliny i jonów wapnia, występuje przede wszystkim w śródbłónku naczyniowym i jest odpowiedzialna za 95% produkcji NO w jego komórkach. Pozostała część NO powstaje prawdopodobnie w wyniku aktywności syntazy

indukowalnej [87-89]. Wszystkie postaci syntazy NO ulegają zahamowaniu pod wpływem strukturalnych analogów L-argininy:

-L-NIO (N-iminoethyl-L-ornithine)

-L-NMMA (NG-monomethyl-L-arginine monoacetate)

-L-NNA (NG-nitro-L-arginine)

-L-NAME (NW-nitro-L-arginine methylester)

Związki te wykazują różnego stopnia zdolność do hamowania enzymatycznej aktywności syntazy NO. Na podstawie eksperymentów stwierdzono, że najsilniejszym inhibitorem jest L-NIO, następnie L-NMMA i L-NNA a L-NAME wykazuje najmniejszą zdolność hamowania [90]. Ponadto okazało się, że działanie tych inhibitorów można odwrócić poprzez równoczesne podanie L-argininy czego nie można osiągnąć stosując D-argininę. Ze względu na specyficzne własności syntazy konstytutywnej polegające na tym, że wymaga ona do osiągnięcia pełnej aktywności obecności kalmoduliny i jonów wapnia istnieje dodatkowa możliwość jej blokowania. Zastosowanie antagonistów kalmoduliny np: Mellitin, Trifluoroperazine również prowadzi do zahamowania syntezy tlenku azotu [91-92]. Aktywność syntazy konstytutywnej NO jest kontrolowana także przez sam NO na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. Wydłużenie półokresu rozpadu tlenku azotu przez zastosowanie dysmutazy nadtlenkowej znacznie zmniejsza jego produkcję natomiast oksyhemoglobina niszcząca pozakomórkowy NO wzmacnia aktywność syntazy [93]. Biosyntezę NO można także zablokować na poziomie transportu błonowego L-argininy. Stwierdzono, że L-ornityna, L-lizyna hamują

wychwyt L-argininy przez komórki śródbłonna naczyniowego co w efekcie prowadzi do spadku syntezy NO [94]. Powyższe aminokwasy nie są wykorzystywane jako substraty przez syntazę NO i nie wpływają na jej aktywność. Własności tlenku azotu, sposoby hamowania jego syntezy czy jego udział w procesach fizjologicznych w dalszym ciągu nie są do końca wyjaśnione.

C E L P R A C Y

Celem pracy jest wykazanie jaką rolę odgrywa tlenek azotu:

- w regulacji trzustkowego przepływu krwi
- w regulacji sekrecji trzustki
- w patogenezie ostrego zapalenia trzustki

W związku z tym zostało przeprowadzonych szereg doświadczeń z wykorzystaniem:

- substratu tlenu azotu: aminokwasu L-argininy
- blokera syntazy NO: L-NNA (NG-nitro-L-arginina)
- kombinacji obu powyższych substancji

1. Badania nad sekrecją trzustkową zostały przeprowadzone *in vivo* na szczurach z przewlekłymi przetokami trzustkowymi oraz *in vitro*, na izolowanych pęcherzykach trzustkowych aby wykazać czy tlenek azotu działa bezpośrednio na zewnątrzwydzielniczą aktywność trzustki czy pośrednio poprzez zmiany w trzustkowym przepływie krwi. Doświadczenia wykonano w warunkach wydzielania podstawowego i stymulowanego: pokarmem, infuzją ceruleiny, urecholiney, CCK-8 oraz wyprowadzaniem soku trzustkowego na zewnątrz. Zmiany sekrecji trzustkowej zostały określone na podstawie pomiarów objętości soku trzustkowego, wielkości wyrzutu białka i aktywności amylazy.

2. Pomiary przepływu krwi zostały wykonane metodą laserową, na zwierzętach znajdujących się w narkozie, w warunkach fizjologicznej sekrecji trzustkowej oraz po wywołaniu zmian patologicznych.

3. Do określenia roli NO w patogenezie ostrego zapalenia trzustki został wykorzystany doświadczalny model polegający na wywoływaniu uszkodzeń wysokimi dawkami ceruleiny. Rozległość i intensywność zmian patologicznych została oceniona na podstawie zmian ciężaru trzustki, obrazu histopatologicznego oraz zawartości białka w tkance trzustkowej.

M E T O D Y K A

Badania zostały przeprowadzone na około 300 szczurach płci męskiej, rasy Wistar, o wadze 250-300 gramów. Zwierzęta były karmione granulatem zawierającym zestaw niezbędnych składników pokarmowych oraz posiadały swobodny dostęp do wody.

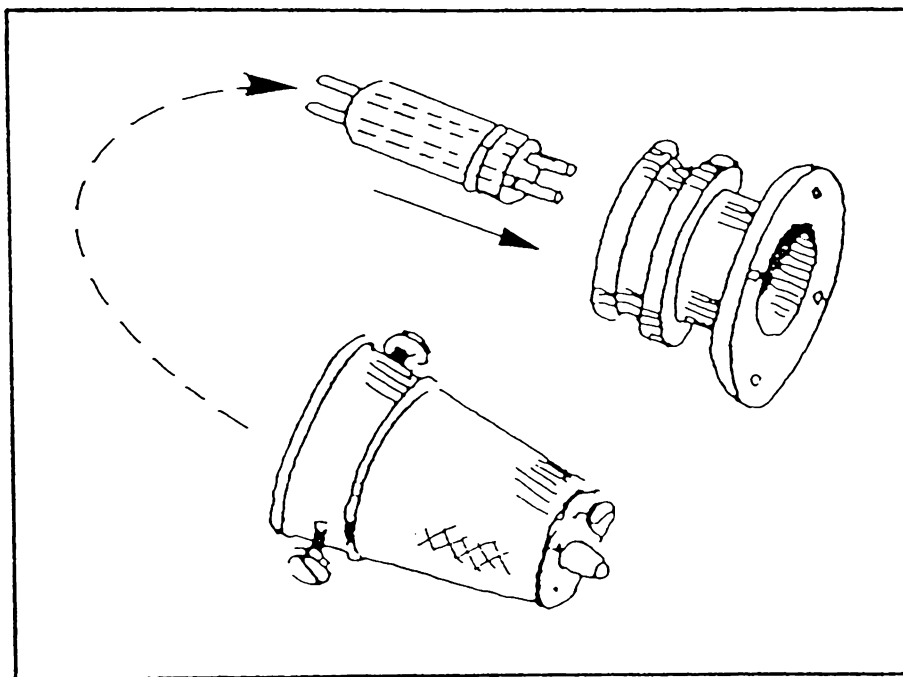
I. Badania dotyczące sekrecji trzustkowej zostały wykonane metodą *in vivo* na zwierzętach posiadających przewlekłe przetoki trzustkowe oraz *in vitro* wykorzystując izolowane pęcherzyki trzustkowe.

Badania *in vivo*

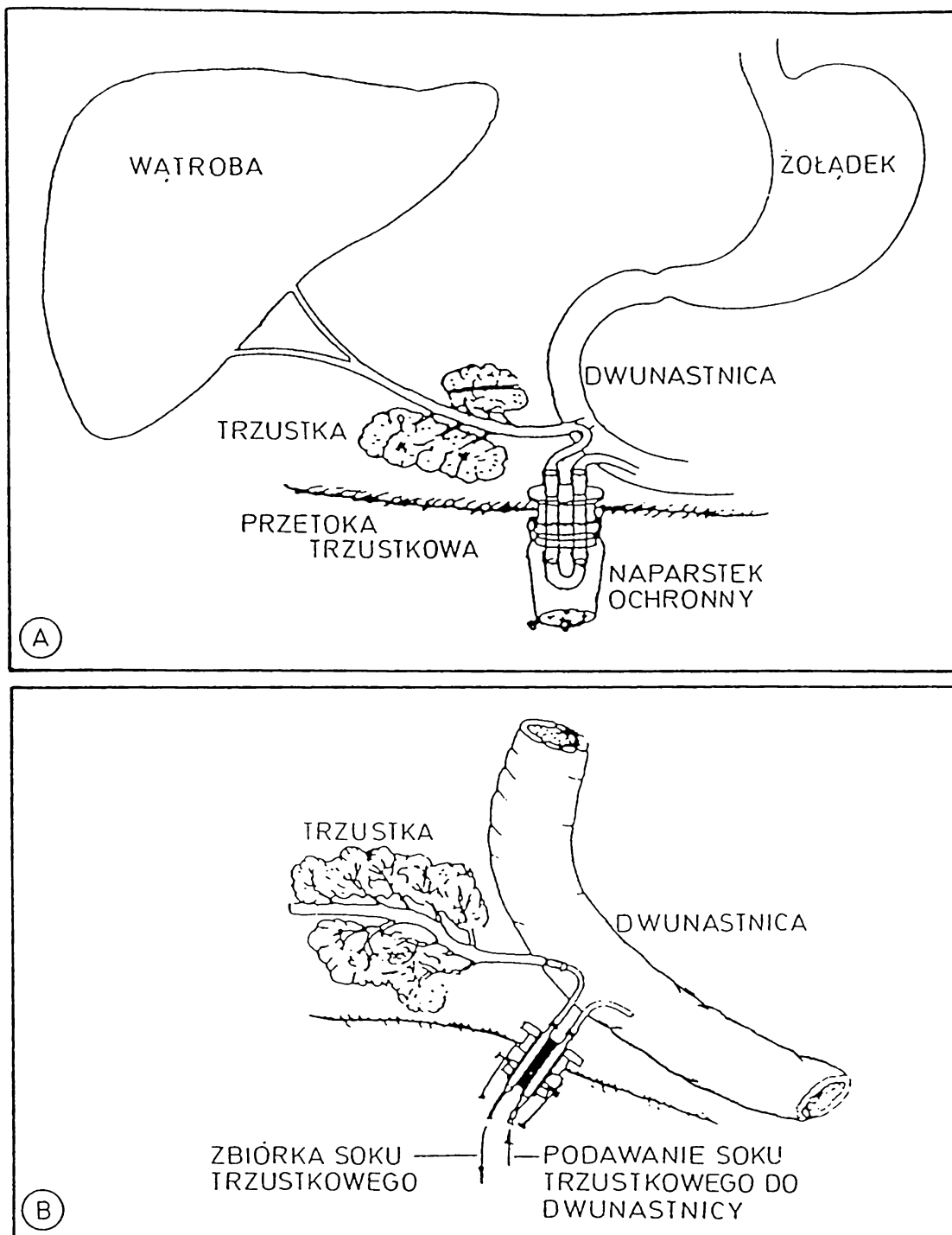
1. Zakładanie przetok trzustkowych.

Zwierzęta głodzono, z zapewnieniem swobodnego dostępu do wody, przez 24 godziny poprzedzające operację wszywania przetok trzustkowych. Zabieg został wykonany w narkozie eterowej. Powłoki jamy brzusznej, po uprzedniej dezynfekcji, zostały rozcięte w lini środkowo-obojęczykowej prawej (długość rozcięcia wynosi około 1.5-2 cm). Następnie wydobyto dwunastnicę oraz sieć, w której przebiega przewód wspólny trzustkowo-żółciowy. Na wysokości miejsca, w którym przewód uchodzi do dwunastnicy została nacięta jego ściana a następnie wprowadzono do niego dren polietylenowy (PE 50), który został przyszyty do ściany jelita nićmi chirurgicznymi. Taki sam dren został wprowadzony do światła dwunastnicy w bliskim sąsiedztwie drenu trzustkowo-żółciowego. Oba dreny za pośrednictwem plastikowego pierścienia wszytego w powłoki brzuszne wyprowadzono

na zewnątrz i połączono w celu zapewnienia prawidłowego odpływu soku trzustkowego z przewodu trzustkowo-żółciowego do dwunastnicy. Całość zabezpieczona jest metalowym, nierdzewnym naparstkiem zdejmowanym na czas trwania eksperymentu (ryc.12). Po zakończeniu zabiegu zwierzęta otrzymały kroplówkę z roztworu soli fizjologicznej i Chlorocidu (około 10 ml). Zszyte powłoki brzuszne pokryto warstwą Akutolu.



Ryc.12 Schemat szpuli z dopasowanym tłoczkiem oraz z przykręconym do niej naparstkiem o ruchomym wieczku.



Ryc.13 Schemat przetoki trzustkowej i przetoki dwunastniczej oraz osłaniającego je naparstka w okresie pomiędzy doświadczeniami (A) i w czasie zbierania soku trzustkowego (B) z równoczesnym podawaniem soku do dwunastnicy.

Eksperymenty wydzielnicze rozpoczynano po upływie około 6-7 dni od operacji. W tym czasie zwierzęta były codziennie umieszczane na czas około 1-2 godzin w pojedynczych klatkach, zdejmowano ochronny naparstek, rozłączano oba dreny a następnie w celu sprawdzenia drożności drenu trzustkowo-żółciowego przepłukiwano go niewielką ilością roztworu soli fizjologicznej o temperaturze 37°C [95-97].

2. Doświadczenia wydzielnicze.

Przed każdym doświadczeniem szczury głodzono przez 24 godziny zapewniając im swobodny dostęp do wody. W czasie trwania doświadczeń zwierzęta znajdowały się w indywidualnych klatkach typu Bollman, z przetok zdejmowano chroniące je naparstki i rozłączano dreny. Dren trzustkowo-żółciowy był wykorzystywany do otrzymywania soku trzustkowego, a dren dwunastniczy do jego reinfuzji do dwunastnicy (ryc.13). Czas trwania każdego doświadczenia wynosił 3 godziny. Sok trzustkowy zbierano w 15 minutowych frakcjach, przechowywano w temperaturze 4°C do momentu ukończenia eksperymentu a następnie mierzono objętość każdej próbki oraz oznaczano zawartość w niej białka i aktywność amylazy .

Badania przeprowadzono w czterech grupach eksperymentalnych, każda liczyła po około 40 szczurów. Zwierzęta z pierwszej grupy wykorzystano do badań nad wydzielaniem podstawowym. Przez dren dwunastniczy podawano do jelit sok trzustkowy z szybkością 4 ml/h, rozcieńczony w stosunku 1:4 z roztworem soli

fizjologicznej. Drugą grupę stanowiły zwierzęta z reinfuzją soku trzustkowego i pokarmową stymulacją trzustki. Szczury karmiono mieszaniną białego pieczywa i mleka w proporcji 1:1 przez pierwsze 15 minut trwania eksperymentu [96-97]. W trzeciej grupie oprócz reinfuzji soku wykonano hormonalne pobudzanie wydzielania trzustkowego. Podawano podskórnie ceruleinę w dawce 0.5 ug/kg/h rozpuszczoną w 0.9% NaCl, objętość pojedynczej dawki wynosiła 1 ml. Pierwsze wstrzyknięcie zostało wykonane na początku eksperymentu a następnie powtórzone dwukrotnie w odstępach godzinnych. Czwarta grupa zwierząt nie otrzymała reinfuzji soku trzustkowego, wykonano tutaj jedynie zbiórke soku traktując wyprowadzanie soku trzustkowego jako kolejny bodziec stymulujący wydzielanie trzustkowe.

W grupach eksperymentalnych wykonano cztery testy do każdego używając po około 10 szczurów. Jeden z testów stanowił kontrolę, która otrzymywała tylko iniekcję 0.9% NaCl i.v.. Kolejny test polegał na dożylnym podaniu blokera syntazy tlenu azotu L-NNA w dawce 2.5 mg/kg (bolus). Następny test to dożylne wstrzyknięcie substratu dla syntazy NO aminokwasu L-argininy w dawce 50 mg/kg (bolus). Ostatni test polegał na podaniu kombinacji tych substancji przy czym iniekcja została wykonana w dwóch etapach. Najpierw podano L-NNA a później L-argininę. Preparaty podawano po pierwszej godzinie trwania eksperymentu do żył ogonowych. Rozpuszczano je w roztworze soli fizjologicznej i podawano w objętości 1 ml. Roztwory były przygotowywane bezpośrednio przed wykonaniem iniekcji.

3. Oznaczanie zawartości białka w próbkach soku trzustkowego.

Wyrzut białka trzustkowego został określony przy użyciu metody rutynowo wykorzystywanej w doświadczeniach przeprowadzanych w Instytucie Fizjologii. Z każdej frakcji soku trzustkowego pobrano 10 μ l i dopełniono do objętości 10 ml wodą destylowaną. Następnie dokonano pomiaru spektrofotometrycznego przy dł. fali 280 nm. Otrzymany wynik porównano z krzywą standartową wykreśloną na podstawie kolejnych rosnących stężeń białka. Wielkość wyrzutu wyrażono w mg% [98,99].

4. Oznaczanie aktywności amylazy w soku trzustkowym.

Do oznaczania aktywności amylazy trzustkowej wykorzystano metodę Bernfelda [100]. Z każdej otrzymanej frakcji soku trzustkowego pobrano 20 μ l soku po czym próbkę uzupełniono buforem fosforanowym o pH 6.9 do objętości 0.5 ml i zanurzone w wodzie o temperaturze 0°C. Kolejny etap polegał na dodaniu do każdej próbki po 0.5 ml zimnego substratu skrobiowego i następczej inkubacji w temperaturze 30°C. Po 10 minutach próbkę ponownie umieszczono w wodzie o temperaturze 0°C. W celu przerwania zachodzącej w soku trzustkowym reakcji enzymatycznej dodano do każdej frakcji po 0.5 ml tzw czynnika koloryzującego (kwas 3,5 dwunitrosalicylowy, winian sodowo-potasowy, 5 M NaOH) a następnie umieszczono próbki w kąpieli wodnej o temperaturze 100°C na okres 10 minut. Po upływie tego czasu próbki zostały ostudzone do temperatury pokojowej po

czym dodano do każdej po 10 ml podwójnie destylowanej wody. Optyczna gęstość próbek zawierających brązowy produkt reakcji została określona fotometrycznie za pomocą zielonego filtra (długość fal 540 nm). Otrzymany wynik z kolorymetru został porównany z krzywą standartową wykreśloną na podstawie próbek ślepych sporządzonych z maltozy w taki sam sposób jak próbki badane. Aktywność amylazy wyrażono w jednostkach międzynarodowych:

$$U = 1 \text{ umol maltozy} / \text{min} \times \text{ml roztworu}$$

Badania *in vitro*

1. Izolowanie pęcherzyków trzustkowych.

Badania *in vitro* zostały przeprowadzone na pęcherzykach trzustkowych otrzymanych zgodnie z metodą Amsterdam [101-103]. Zwierzęta uśmiercano przez dekapitację i po otwarciu jamy brzusznej izolowano trzustkę, którą następnie umieszczano w około 30 ml roztworu buforującego zawierającego: Krebs Ringer Hepes Buffer (Hepes, glutamina, glukoza, NaCl, KCl, KH_2PO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 , aminokwasy) z dodatkiem 0.1 mg/ml inhibitora trypsyny i albumin. Po oczyszczeniu z tkanki tłuszczowej trzustkę rozpinano na płytce woskowej, rozdrabniano po czym nastrzykiwano 10 ml roztworu kolagenazy o koncentracji 300-400 j m/10 ml. Przygotowany w ten sposób preparat umieszczano w butelce Erlenmeyera, natleniono, szczelnie zamykano i poddawano inkubacji w temperaturze 37°C w

łaźni wodnej z wytrząsarką. Po 15 minutach zawartość butelki została trzykrotnie przepłukana 5 ml roztworu buforującego po czym dodano 5 ml świeżego roztworu kolagenazy, ponownie natleniono i poddano inkubacji w takich samych warunkach jak wcześniej przez 20 minut. Po zakończeniu okresu inkubacji, w celu rozdzielenia pęcherzyków trzykrotnie zaaspirowano zawartość butelki Erlenmeyera używając pipet o coraz mniejszej średnicy: 1.2 mm, 0.8 mm, 0.5 mm, po czym pęcherzyki przefiltrowano (Nitex gauze 200 μ m) i przepłukano 5 ml buforu. Kolejny etap polegał na wirowaniu pęcherzyków (500 obrotów/min) przez 15 sekund. Otrzymany w ten sposób osad został oddzielony od supernatantu i rozpuszczony w 1-2 ml roztworu buforującego. Powyższą czynność powtórzono jeszcze dwukrotnie a ostatecznie otrzymany osad rozpuszczono w 30-80 ml buforu. Do przygotowanej w ten sposób zawiesiny pęcherzyków dodawana była testowana substancja w odpowiedniej koncentracji a następnie po natlenieniu miała miejsce inkubacja w temperaturze 37°C w łaźni wodnej z wytrząsarką przez 20 minut. Po zakończeniu inkubacji zawiesina została poddana wirowaniu (1000 obrotów/min) przez okres 5 minut. Oddzielony osad od supernatantu umieszczono w 1 ml buforu trawiącego o pH 7.5 aby rozpuścić pozostałe błony komórkowe i uwolnić amylazę znajdującą się jeszcze we wnętrzu komórek pęcherzykowych.

2. Badania wydzielnicze.

Wyzolowane pęcherzyki zostały wykorzystane do badań nad wydzielaniem podstawowym i stymulowanym CCK-8 lub urecholina, które dodawane były do płynu inkubacyjnego w odpowiednich koncentracjach: CCK-8 w koncentracji 10^{-12} M a urecholina 10^{-5} M. W obu przypadkach tzn w warunkach podstawowych i stymulowanych wykonano po cztery rodzaje testów, do każdego wykorzystując pęcherzyki otrzymane od dwóch szczurów. Pierwszy test stanowił kontrolę a następne polegały na tym, że do zawiesiny inkubacyjnej dodawano L-NNA, L-argininę lub ich kombinację. Substancje podawane były we wzrastających koncentracjach od 10^{-5} M do 10^{-3} M.

3. Oznaczanie aktywności amylazy.

Aktywność amylazy oznaczono metodą Bernfelda [100] w osadzie oraz w supernatancie otrzymanych po ostatnim wirowaniu. Wyrażono ją jako procent całkowitej aktywności amylazy (amylaza zawarta w supernatancie i w osadzie).

II. Pomiar przepływu krwi przez trzustkę.

1. Metodyka pomiaru przepływu krwi przez trzustkę.

Trzustkowy przepływ krwi mierzono techniką laserową Dopplera przy użyciu Laserflo, model BPM 403 A (Blood Perfusion Monitor Vasamedics Inc., St Paul, MN USA). Wartość zerowa przepływu została określona przez przyłożenie sondy do neutralnej powierzchni np. białej bibuły. Powierzchnia emisji promienia laserowego wynosi

1 mm a głębokość penetracji tkanek 3-5 mm. Wartość przepływu wyrażona w ml/min/100 g tkanki była bezpośrednio odczytywana z monitora przepływomierza. Technika ta był mierzony całkowity przepływ krwi przez trzustkę [98-99].

2. Pomiar przepływu krwi podczas wydzielania podstawowego i stymulowanego.

Zwierzęta, u których dokonywano pomiarów znajdowały się w narkozie wywołanej podaniem Vetbutalu (0.5 ml/kg i.p.). Pomiar dokonywano co 15 minut przykładając sondę przepływomierza do przedniej powierzchni trzustki w trzech różnych miejscach (wynik traktowany był jako średnia pomiarów otrzymanych z tych miejsc). Całkowity czas trwania eksperymentu wynosił dwie godziny. W odstępach pomiędzy pomiarami rozcięte powłoki brzuszne łączyło się spinakami Backhaus'a oraz pokrywano płatkami gazy nasączonej roztworem soli fizjologicznej o temperaturze 37°C.

Pomiary przepływu krwi zostały wykonane w warunkach podstawowych i stymulowanych ceruleiną (0.5 ug/kg/h s.c.). Przeprowadzono test kontrolny oraz testy z dożylnym podaniem L-NNA w dawce 2.5 mg/kg, L-argininy w dawce 50 mg/kg lub obu substancji równocześnie. Do każdego testu wykorzystano po 2-3 szczury.

III. Badania dotyczące patogenezы ostrego zapalenia trzustki.

1. Wywoływanie ostrego zapalenia trzustki.

Zwierzęta głodzono, pozostawiając im swobodny dostęp do wody, przez 18 godzin poprzedzających początek eksperymentu. Szczury umieszczano, na czas trwania doświadczenia, w pojedynczych klatkach typu Bollman. Ostre zapalenie trzustki otrzymywano przez podawanie podskórne ceruleiny w dawce 10 ug/kg/h, z szybkością 1 ml/h, przez okres pięciu godzin. Ceruleina rozpuszczona była w roztworze soli fizjologicznej, przygotowywano ją bezpośrednio przed eksperymentem [98-99].

2. Badania z wykorzystaniem eksperymentalnego modelu ostrego zapalenia trzustki.

Eksperymenty przeprowadzono na dwóch grupach zwierząt. Pierwszą stanowiły szczury z ostrym zapaleniem trzustki wywołanym w wyżej opisany sposób zaś druga grupa obejmowała szczury, które otrzymały pięciogodzinna podskórną infuzję 0.9% NaCl z szybkością 1 ml/h. Przed rozpoczęciem infuzji ceruleiny lub roztworu soli fizjologicznej każdą grupę podzielono na cztery podgrupy liczące po 6-8 zwierząt. Jedna z nich stanowiła kontrolę, która otrzymała wyłącznie ceruleinę lub 0.9% NaCl. W następnych podgrupach podano do żyły ogonowej bolus L-NNA w dawce 20 mg/kg lub L-argininy w dawce 100 mg/kg lub obie substancje razem (najpierw L-NNA a później L-argininę). Iniekcji dokonywano w momencie rozpoczęcia infuzji

ceruleiny lub soli fizjologicznej.

3. Pomiar przepływu krwi w trzustce.

Po zakończeniu pięciogodzinnej infuzji zwierzęta usypiano Vetbutalem (0.5 ml/kg i.p.). Powłoki jamy brzusznej rozcinano w linii środkowej ciała a następnie po ekspozycji trzustki dokonywano pomiarów przepływu krwi metodą laserową Dopplera podobnie jak we wcześniejszych eksperymentach.

4. Badanie histologiczne trzustki.

Badanie zostało wykonane przez dwóch doświadczonych histologów, którzy nie byli poinformowani jakiego rodzaju substancje były testowane. Z trzustki pobierano wycinek, który umieszczano w 10% formalinie a następnie barwiono hematoksyliną i eozyną. W ocenie preparatów brano pod uwagę:

a) obrzęk, którego rozległość określano w czterostopniowej skali:

0-brak obrzęku

1-obrzęk międzyczrakowy

2-obrzęk międzyczrakowy ze śladami wewnątrzczrakowego

3-obrzęk międzyczrakowy i silnie zaznaczony wewnątrzczrakowy

b) infiltrację leukocytów stopniowana:

0-brak infiltracji

1-niewielka infiltracja okołonaczyniowa

2-infiltracja okołonaczyniowa ze śladami infiltracji rozlanej

3-silnie zaznaczona infiltracja leukocytów

c) stopień wakuolizacji wyrażony poprzez procent komórek, które uległy temu procesowi:

0-brak wakuolizacji

1-mniej niż 25% komórek uległo wakuolizacji

2-25%-50% komórek uległo wakuolizacji

3-więcej niż 50% komórek uległo wakuolizacji

5. Ocena zawartości białka w trzustce.

Zawartość białka w trzustkach wyizolowanych ze szczurów, które poddano pięciogodzinnej hiperstymulacji ceruleinowej została określona na podstawie metody Lowrego [104]. Metoda ta była wielokrotnie wykorzystywana w badaniach przeprowadzonych w Instytucie Fizjologii.

IV. Statystyczne opracowanie wyników

Analiza statystyczna została dokonana w oparciu o test t-Studenta. Wszystkie wyniki podano jako średnie $\pm$ odchylenie standardowe, za statystycznie znamienne uznając te, których wartości $p < 0,05$.

P R E P A R A T Y U Ż Y W A N E D O D O Ś W I A D C Z E Ń

1. L-NNA (NG-Nitro-L-Arginina), Sigma Chemical Co P.O.Box 14508
St Louis, MO 63178
2. L-Arginina (/Elektrolyt-Konzentrat L-Arginin-hydrochlorid 21%
Braun), B.Braun Melsungen AG, 3508 Melsungen
3. Caeruleina Takus 40ug (Ceruleid Tris-(diethylamin)-Salz 3
H₂O), Farmitalia Carlo Erba GmbH-7800 Freiburg
4. CCK-8, Squibb Inc. Princetown N.Y.
5. Urecholine (betanecol chloride) MSD, 5 mg per ml, Merck Sharp
and Dohme
6. Collagenase Sigma Chemical Co (Clostridiopeptidase A, EC
3.4.2.4.3) from Clostridium histolyticum typ VII
7. Vetbutal, Puławskie Zakłady Przemysłu Bioweterynaryjnego-
Biowet
8. Chlorocid - EGIS, Zakłady Farmaceutyczne Budapeszt, Węgry.

1. Sekrecja trzustki w badaniach *in vivo* oraz *in vitro*.

W badaniach nad wydzielaniem trzustki u zwierząt z przewlekłymi przetokami trzustkowymi wykorzystano trzy rodzaje bodźców stymulujących aktywność komórek pęcherzykowych. Pokarm podawany przez pierwsze 15 minut trwania eksperymentu spowodował wzrost wyrzutu białka trzustkowego o 83% w stosunku do kontroli. Sekrecja protein utrzymywała się na tym poziomie przez trzy godziny zbierania próbek soku trzustkowego (ryc.14). Kolejnym bodźcem użytym do pobudzenia wydzielania trzustkowego była ceruleina-strukturalny analog cholecystokininy. Wykonano trzygodzinna, podskórną infuzję ceruleiny (0.5 ug/kg/h). Wyrzut białka w ciągu pierwszej godziny infuzji wzrósł o 110% w porównaniu z kontrolą. Następnie zmniejszył się o około 50%. Wartość ta utrzymywała się przez kolejne dwie godziny eksperymentu (ryc.14). Wyprowadzanie soku trzustkowego na zewnątrz spowodowało stopniowy wzrost wydzielania trzustkowego. Maksymalny wyrzut białka został osiągnięty pod koniec drugiej godziny pomiarów, był wówczas większy o 63% od wartości kontrolnej i utrzymał się na tym poziomie do końca trwania eksperymentu (ryc.14). Wydzielanie amylazy przez komórki pęcherzykowe trzustki uległo podobnym zmianom pod wpływem bodźców stymulujących jak wyrzut białka trzustkowego (tabela 1).

W czasie trwania trzygodzinnego eksperymentu *in vivo* sekrecja białka w warunkach podstawowych wykazywała niewielkie wahania osiągając wartość średnią około 24 mg/h. Dożylna iniekcja L-NNA, blokera syntazy tlenu azotu, w dawce 2.5 mg/kg wykonana po godzinie wydzielania podstawowego spowodowała niewielki spadek wyrzutu białka wynoszący 21% (ryc.15,15a). Substrat wykorzystywany do syntezy NO L-arginina podany w dawce 50 mg/kg, w taki sam sposób jak bloker, nie wpłynął znacząco na zmianę wydzielania białka (ryc.15,15b). Natomiast L-arginina (50 mg/kg i.v.) podana razem z L-NNA (2.5 mg/kg i.v.) spowodowała prawie całkowite zniesienie hamującego działania blokera w stosunku do wydzielania białka trzustkowego (ryc.15,15c). Wydzielanie amylazy uległo podobnym zmianom jak wyrzut białka po L-NNA, L-argininie lub ich kombinacji (tabela 1).

Podanie zwierzętom pokarmu na początku doświadczenia było przyczyną wzrostu wydzielania białka do średniej, wartości 47 mg/h utrzymującej się przez trzy godziny trwania pomiarów. Po iniekcji L-NNA (2.5 mg/kg i.v.) wykonanej po godzinnej zbiórce soku trzustkowego sekrecja białka uległa redukcji o 57% (ryc. 16,16a). Natomiast po podaniu L-argininy (50 mg/kg i.v.) nie otrzymano statystycznie znamiennej zmiany wartości wyrzutu białka (ryc.16,16b). Hamowanie popokarmowej sekrecji protein przez L-NNA uległo prawie całkowitemu zniesieniu gdy razem z blokerem podano L-argininę. Wyrzut białka był wówczas mniejszy od wartości uzyskanych w grupie kontrolnej jedynie o 10% (ryc. 16,16c).

Sekrecja amylazy wykazywała w przeprowadzonych testach podobny profil zmian (tabela 1).

W kolejnej grupie zwierząt z przewlekłymi przetokami trzustkowymi, w której bodźcem stymulującym była ceruleina (0.5 ug/kg/h-3 godz s.c.) wyrzut białka osiągnął w pierwszej godzinie infuzji wartość 54.3 mg/h, a następnie uległ redukcji do 40.9 mg/h utrzymując się na tym poziomie do końca pomiarów. Po podaniu L-NNA (2.5 mg/kg i.v.) wyrzut białka zmniejszył się o 37% (ryc.17,17a). Efekt ten został częściowo odwrócony przez L-argininę (50 mg/kg i.v.) podaną równocześnie z inhibitorem syntazy NO (ryc.17,17c). Iniekcja samej L-argininy spowodowała dalszy wzrost wydzielania trzustkowego przy czym nie osiągnął on statystycznej znamienności (ryc.17,17b). Podobnie jak sekrecja protein przedstawia się wydzielanie amylazy (tabela 1).

Wyprowadzanie soku trzustkowego na zewnątrz spowodowało stopniowy wzrost sekrecji białka. W pierwszej godzinie eksperymentu średnia wartość wyrzutu wyniosła 36 mg/h, a następnie wzrosła do 42 mg/h pod koniec drugiej godziny obserwacji. Redukcja wyrzutu protein o 53% została spowodowana podaniem L-NNA (ryc.18,18a). Równoczesna iniekcja L-argininy w znacznym stopniu osłabiła hamujące działanie L-NNA na wyrzut białka, który w tym teście był mniejszy jedynie o 19% od wartości kontrolnej (ryc.18,18c). Administracja L-argininy spowodowała mało istotną zmianę wielkości wydzielania białka pobudzanego odprowadzaniem soku trzustkowego (ryc.18,18b). Uwalnianie amylazy przez komórki pęcherzykowe również

w tych testach wykazywało podobny charakter zmian jak wyrzut białka trzustkowego (tabela 1).

Rozproszone izolowane pęcherzyki trzustkowe wykazywały spontaniczne uwalnianie amylazy zarówno w warunkach podstawowych jak i stymulowanych. Pod wpływem CCK-8 (10^{-12} M) lub urecholiny (10^{-5} M) nastąpił prawie trzykrotny wzrost sekrecji amylazy przez komórki pęcherzykowe. Wydzielanie amylazy w warunkach podstawowych oraz stymulowanych nie uległo w istotny sposób zmianie po dodaniu we wzrastających koncentracjach (10^{-5} M - 10^{-3} M) do środowiska inkubacyjnego L-NNA, L-argininy lub ich kombinacji (tabela 2).

2. Przepływ krwi przez naczynia trzustkowe.

Pomiaru przepływu krwi przez trzustkę dokonano przy użyciu laserowego przepływomierza Dopplera. W warunkach wydzielania podstawowego przepływ krwi przez trzustkę wynosił około 41 ml/min/100g u zwierząt znajdujących się w narkozie. Iniekcja L-NNA (2.5 mg/kg i.v.) spowodowała spadek wielkości przepływu o 25% przy czym równoczesne podanie L-argininy (50 mg/kg i.v.) znosiło całkowicie działanie inhibitora syntazy tlenku azotu. Podanie samej L-argininy zwiększyło przepływ o 16% w porównaniu z wartością kontrolną (ryc.19). Pod wpływem stymulacji hormonalnej (ceruleina 0.5 ug/kg/h s.c.) przepływ wzrósł o 68% w stosunku do kontroli. Taka sama dawka L-NNA jaka została użyta w pierwszym teście była przyczyną redukcji przepływu o 55%. Równocześnie podana L-arginina prawie całkowicie znosiła hamujące działanie L-NNA. Iniekcja

wylącznie L-argininy spowodowała wzrost przepływu o niecałe 20% w porównaniu z wartością przepływu po podaniu ceruleiny (ryc.19).

3. Zmiany morfologiczne i krążeniowe powstające w czasie ostrego zapalenia trzustki.

Pięciogodzinna, podskórna infuzja ceruleiny w dawce 10 ug/kg/h spowodowała rozwój zmian patologicznych w tkance trzustkowej wszystkich szczurów użytych do badań. Pojawił się znacznego stopnia obrzęk śródzrazikowy, któremu towarzyszył okołonaczyniowy naciek leukocytów oraz wakuolizacja 25% komórek (tabela 3). Ciężar trzustki zwiększył się ponad dwukrotnie (ryc.20), a zawartość w niej białka wzrosła o 22% (ryc.21). Iniekcja L-NNA (20 mg/kg i.v.) na początku infuzji ceruleiny znacznie pogłębiła zmiany histologiczne a zwłaszcza obrzęk i naciek leukocytarny (tabela 3). Ponadto nastąpił dalszy wzrost wagi trzustki (ryc.20) i zawartości w niej białka (ryc.21). W porównaniu z kontrolą ciężar wzrósł o 120% a zawartość białka o 37%. L-arginina (100 mg/kg i.v.) podana podobnie jak inhibitor syntazy NO spowodowała, że uszkodzenia powstające pod wpływem hiperstymulacji ceruleinowej były znacznie mniejsze mieszcząc się pomiędzy 0 a 1 stopniem histologicznej skali zmian patologicznych (tabela 3). Podobnie ciężar trzustki i zawartość w niej białka były znacznie mniejsze od wartości tych parametrów po infuzji wyłącznie ceruleiny (ryc.20,21). W teście, w którym podano L-NNA razem z L-argininą na początku indukcji stanu zapalnego otrzymane

uszkodzenia były znacznie słabiej wyrażone w porównaniu ze zmianami powstałymi pod wpływem L-NNA i ceruleiny. Pod względem histologicznym zmniejszył się przede wszystkim okołonaczyniowy naciek leukocytów oraz liczba zwakuolizowanych komórek (tabela 3). Jak również szczególnej redukcji uległa zawartość białka w trzustce (ryc.21).

U zwierząt, które otrzymały wyłącznie iniekcję L-NNA (20 mg/kg i.v.) zaobserwowano średniego stopnia obrzęk, niewielką infiltrację leukocytów oraz brak wakuolizacji komórek (tabela 3). Zmiany te były znacznie słabiej wyrażone w porównaniu z uszkodzeniami poceruleinowymi. Ciężar trzustki wzrósł o 53% (ryc.20), a zawartość białka o 13% (ryc.21). Podanie L-argininy (100 mg/kg i.v.) razem z L-NNA w znacznym stopniu zapobiegło powstaniu powyższych zmian. W badaniach histologicznych zaobserwowano miernego stopnia obrzęk śródzrazikowy, a pozostałe parametry oscylowały wokół normy (tabela 3, ryc.20,21). Podobnie po iniekcji samej L-argininy nie wystąpiły żadne znaczące zmiany odbiegające od kontroli (tabela 3, ryc.20,21).

Przepływ krwi przez trzustkę zmierzony po pięciogodzinnej infuzji ceruleiny uległ 50% redukcji w porównaniu z przepływem w grupie kontrolnej. Iniekcja L-NNA (20 mg/kg i.v.) na początku infuzji spowodowała dalszy spadek przepływu o 15%. Efekt ten uległ odwróceniu po równoczesnym podaniu L-argininy (100 mg/kg i.v.). U szczurów, którym wstrzyknięto L-argininę na początku infuzji ceruleiny przepływ krwi był niższy od wartości kontrolnej tylko o

18% (ryc.22).

L-NNA bez towarzyszącej hiperstymulacji ceruleinowej spowodował 35% spadek przepływu, przy czym L-arginina powodowała powrót do normy (ryc.22).

Ryc.14. Wydzielanie białka przez komórki pęcherzykowe trzustki *in vivo* w warunkach podstawowych (kontrola) i stymulowanych (pokarmem, ceruleiną 0.5 ug/kg/h s.c., wyprowadzaniem soku trzustkowego na zewnątrz). Do każdego doświadczenia trwającego 3 godziny wykorzystano 10 szczurów z przewlekłymi przetokami trzustkowymi. Pojedyncza kolumna odpowiada wielkości wyrzutu białka w ciągu jednej godziny (wielkość wyrzutu wyrażona jako % kontroli). *oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do kontroli przy $p < 0,05$.

Ryc.15. Zmiany wydzielania *in vivo* białka trzustkowego w warunkach podstawowych spowodowane dożylnym podaniem: 0.9% NaCl (kontrola), L-NNA (2.5 mg/kg), L-Argininy (50 mg/kg) lub kombinacji obu substancji. Każdy test wykonano na 10 szczurach z przewlekłymi przetokami trzustkowymi. *oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do kontroli przy $p < 0,05$. **oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do wartości otrzymanych w teście z L-NNA przy $p < 0,05$.

Ryc.15a. Wpływ dożylnej iniekcji L-NNA (2.5 mg/kg) na wielkość wyrzutu białka trzustkowego obserwowany po pierwszej i drugiej godzinie od momentu podania (czas pomiarów 3 godziny). Wydzielanie białka odbywa się w warunkach podstawowych. Pojedyncza kolumna odpowiada wielkości wyrzutu białka trzustkowego w ciągu jednej godziny (mg/h). Do doświadczenia użyto 10 szczurów posiadających przewlekłe przetoki trzustkowe.

Ryc.15b. Doświadczenia wykonano identycznie jak przedstawia ryc.2a z tą różnicą, że zwierzęta otrzymały L-Argininę (50 mg/kg i.v.).

Ryc.15c. Doświadczenia wykonano tak jak przedstawia ryc.2a, z tym że zwierzęta otrzymały L-NNA (2.5 mg/kg i.v.) oraz L-Argininę (50 mg/kg i.v.).

Ryc.16. Zmiany wydzielania *in vivo* białka trzustkowego stymulowanego pokarmem wywołane dożylną iniekcją: 0.9% NaCl (kontrola), L-NNA (2.5 mg/kg), L-Argininy (50 mg/kg) lub kombinacji L-NNA i L-Argininy. Do każdego 3-godzinnego doświadczenia użyto po 10 szczurów. *oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do kontroli przy $p < 0,05$. **oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do wartości otrzymanych w teście z L-NNA przy $p < 0,05$.

Ryc.16a. Wpływ dożylniej iniekcji L-NNA (2.5 mg/kg) na wielkość wyrzutu białka obserwowany po pierwszej i drugiej godzinie od momentu podania (czas pomiaru 3 godz). Wydzielanie zachodzi w warunkach stymulowanych pokarmem. Do doświadczenia użyto 10 szczurów z przewlekłymi przetokami trzustkowymi. Pojedyncza kolumna odpowiada wielkości wyrzutu białka w ciągu godziny (mg/h).

Ryc.16b. Doświadczenie identyczne z przedstawionym na ryc.3a. Zwierzęta otrzymały L-Argininę (50 mg/kg i.v.).

Ryc.16c. Doświadczenie identyczne z przedstawionym na ryc. 3a. Zwierzęta otrzymały L-NNA (2.5 mg/kg i.v.) oraz L-Argininę (50 mg/kg i.v.).

Ryc.17. Zmiany wydzielania białka trzustkowego w czasie stymulacji ceruleiną 0.5 ug/kg/h s.c. spowodowane dożylnym podaniem: 0.9% NaCl (kontrola), L-NNA (2.5 mg/kg), L-Argininy (50 mg/kg) lub obu substancji równocześnie. Każdy 3-godzinny eksperyment wykonano na 10 szczurach posiadających przewlekłe przetoki trzustkowe. *oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do kontroli przy $p<0,05$. **oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do wartości otrzymanych w teście z L-NNA przy $p<0,05$.

Ryc.17a. Zmiany wielkości sekrecji białek spowodowane dożylnym podaniem L-NNA (2.5 mg/kg) obserwowane po pierwszej i drugiej godzinie od podania (czas pomiaru 3 godziny). Wydzielanie stymulowane ceruleiną 0.5 ug/kg/h s.c. Pojedyncza kolumna prezentuje wyrzut białka w ciągu jednej godziny (mg/h). Wykorzystano 10 szczurów z przewlekłymi przetokami trzustkowymi.

Ryc.17b. Warunki jak na ryc 4a. Szczury otrzymały L-Argininę (50 mg/kg i.v.).

Ryc.17c. Warunki jak na ryc.4a. Szczury otrzymały L-NNA (2.5 mg/kg i.v.) oraz L-Argininę (50 mg/kg i.v.).

Ryc.18. Zmiany wydzielania białka trzustkowego w czasie odprowadzania soku trzustkowego na zewnątrz powodowane dożylną iniekcją: 0.09% NaCl, L-NNA (2.5 mg/kg), L-Argininy (50 mg/kg) lub obu substancji równocześnie. Każdy 3-godzinny test wykonano na 10 szczurach z przewlekłymi przetokami trzustkowymi. *oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do kontroli przy $p<0,05$. **oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do wartości otrzymanych w teście z L-NNA przy $p<0,05$.

Ryc.18a. Wpływ dożylniej iniekcji L-NNA (2.5 mg/kg) na wielkość wyrzutu białka trzustkowego po pierwszej i drugiej godzinie od momentu podania (czas pomiaru 3 godziny). Wydzielanie stymulowane wyprowadzaniem soku trzustkowego na zewnątrz. W doświadczeniu wykorzystano 10 szczurów z przewlekłymi przetokami trzustkowymi. Każda kolumna odpowiada wyrzutowi białka w ciągu jednej godziny (mg/h).

Ryc.18b. Warunki doświadczalne jak na ryc.4a. Szczurom podano L-Argininę (50 mg/kg i.v.).

Ryc.18c. Warunki doświadczalne jak na ryc.4a. Zwierzęta otrzymały L-NNA i L-Argininę.

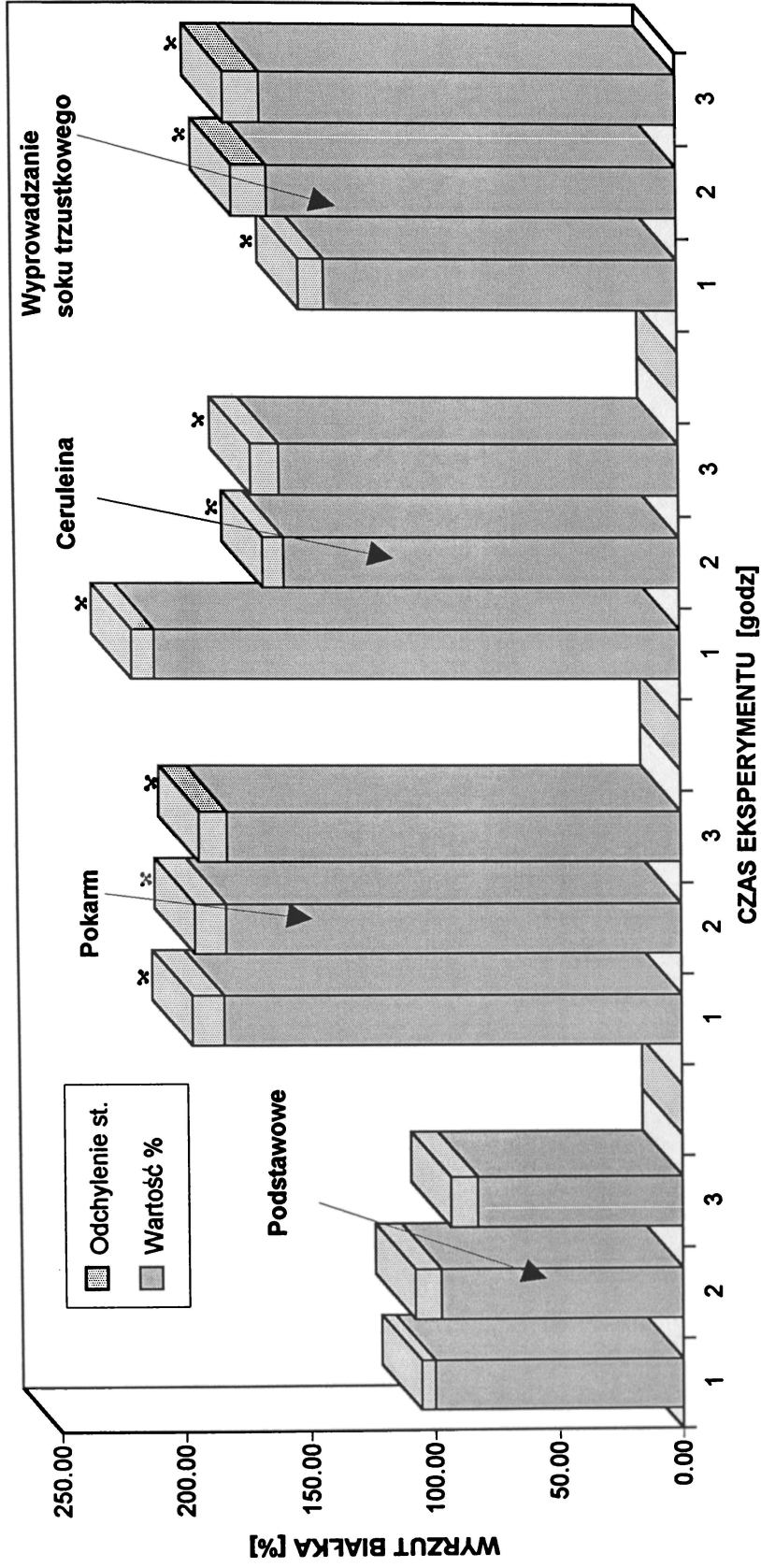
Ryc.19. Przepływ krwi przez trzustkę w warunkach wydzielania podstawowego i stymulowanego ceruleiną 0.5 ug/kg/h s.c. Zmiany spowodowane podaniem i.v.: 0.9% NaCl, L-NNA (2.5 mg/kg), L-Argininy (50 mg/kg) lub obu substancji razem. Każdy 2-godzinny test przeprowadzono na 2 szczurach znajdujących się w narkozie. $P < 0.05$. *oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do wartości otrzymanych w teście z ceruleiną przy $p < 0.05$. **oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do wartości otrzymanych w teście z ceruleiną + L-NNA przy $p < 0.05$.

Ryc.20. Waga trzustek u szczurów po: 5-godz infuzji s.c. 0.9% NaCl (kontrola); 5-godz infuzji s.c. ceruleiny (10 ug/kg/h); 5-godz infuzji s.c. ceruleiny poprzedzonej iniekcją i.v. L-NNA (20 mg/kg), L-Argininy (100 mg/kg) lub obu substancji razem; 5-godz infuzji s.c. 0.9% NaCl poprzedzonej iniekcją i.v. L-NNA (20 mg/kg), L-Argininy (100 mg/kg) lub obu substancji. Każdy test wykonano na 6-8 szczurach. *oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do kontroli przy $p < 0.05$. **oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do testu z ceruleiną przy $p < 0.05$. ***oznacza statystyczną znamienność wyników z odniesieniem do wartości otrzymanych w teście z L-NNA przy $p < 0.05$.

Ryc.21. Zawartość białka w trzustkach (mg). Warunki doświadczenia jak na ryc.20. *oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do kontroli przy $p < 0.05$. **oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do testu z ceruleiną przy $p < 0.05$. ***oznacza statystyczną znamienność wyników z odniesieniem do wartości otrzymanych w teście z L-NNA przy $p < 0.05$.

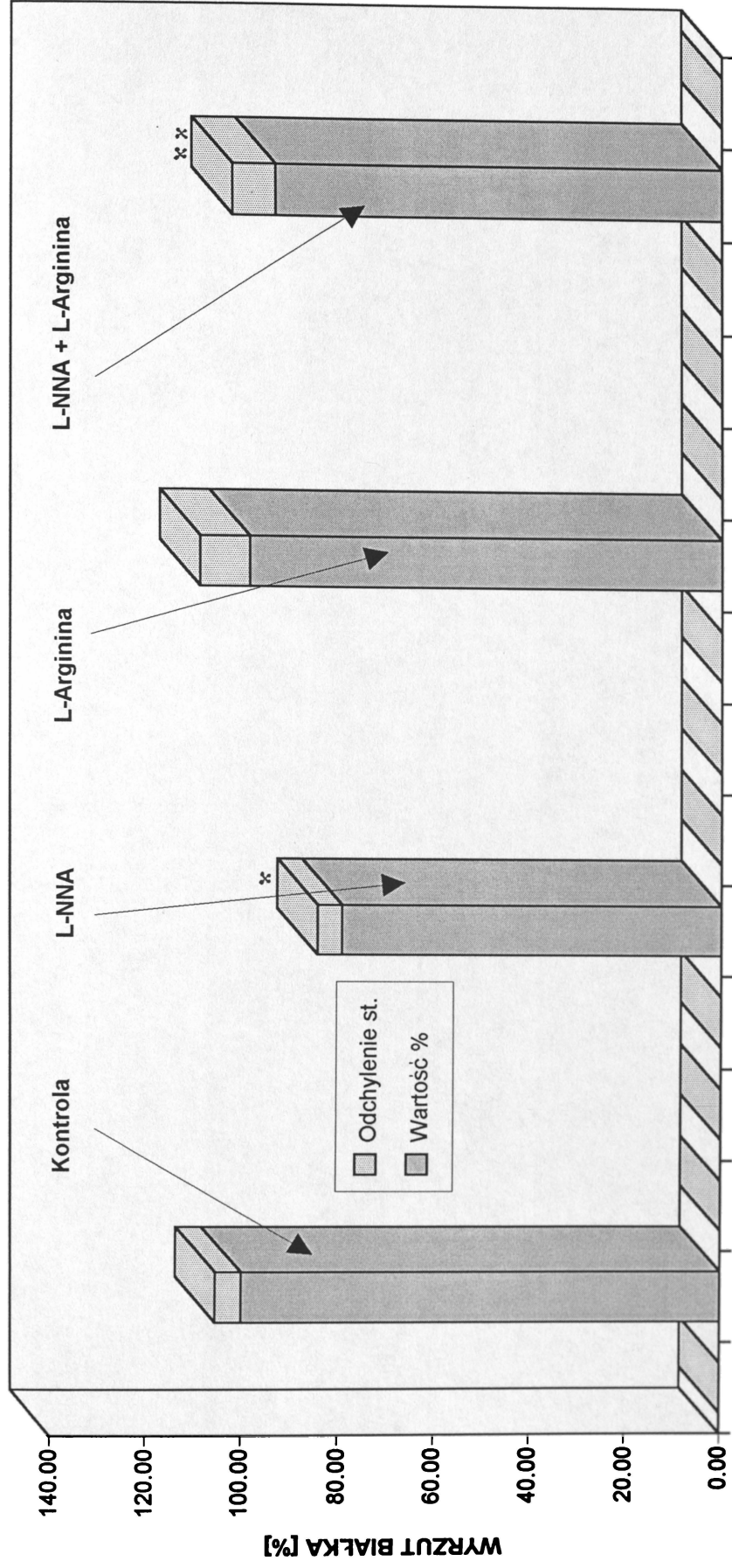
Ryc.22. Przepływ krwi przez trzustkę. Warunki jak na ryc.20.
*oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do kontroli przy $p<0,05$. **oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do testu z ceruleiną przy $p<0,05$. ***oznacza statystyczną znamienność wyników z odniesieniu do wartości otrzymanych w teście z L-NNA przy $p<0,05$.

WYDZIELANIE BIAŁKA IN VIVO W WARUNKACH PODSTAWOWYCH I STYMULOWANYCH



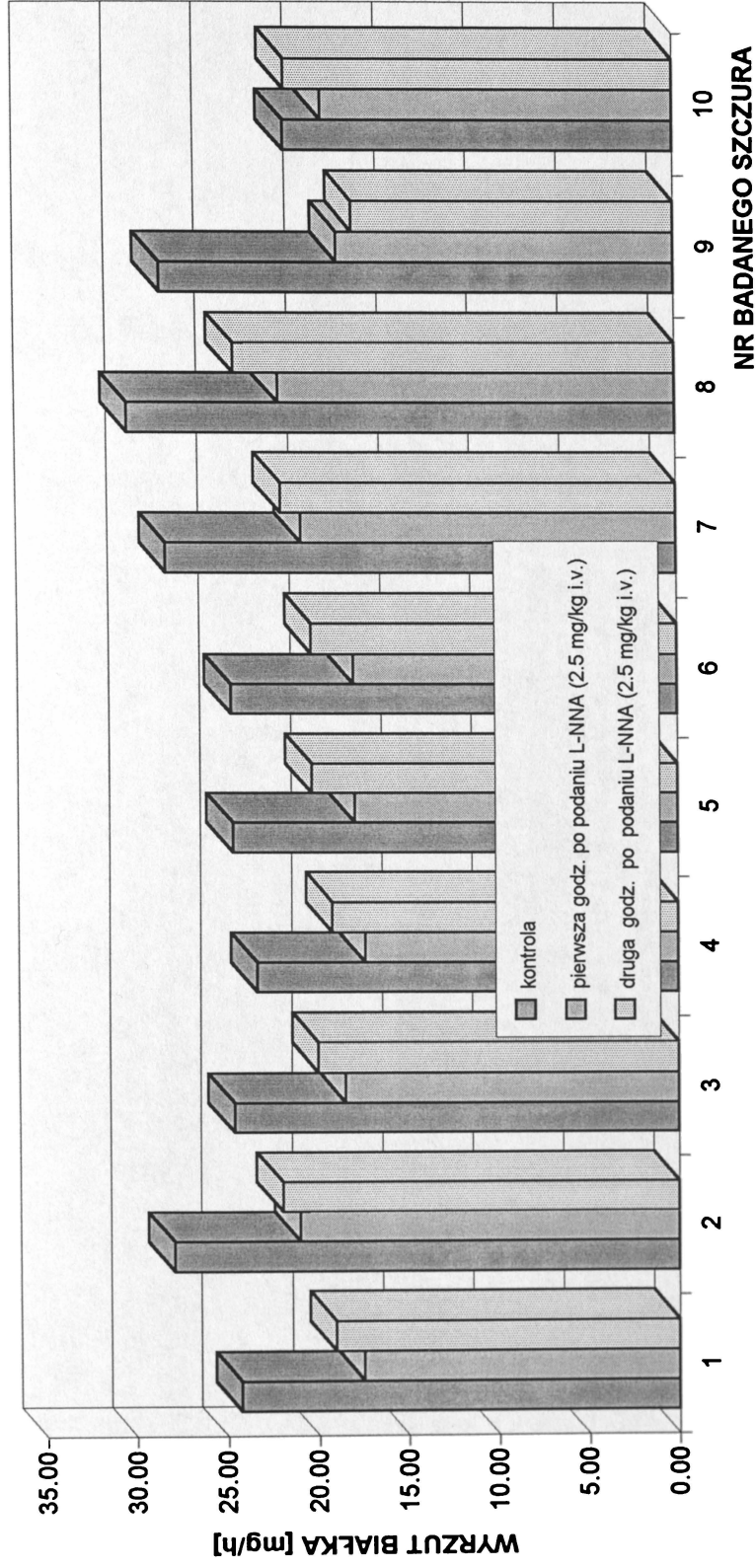
Ryc. 14

WYDZIELANIE BIAŁKA IN VIVO W WARUNKACH PODSTAWOWYCH



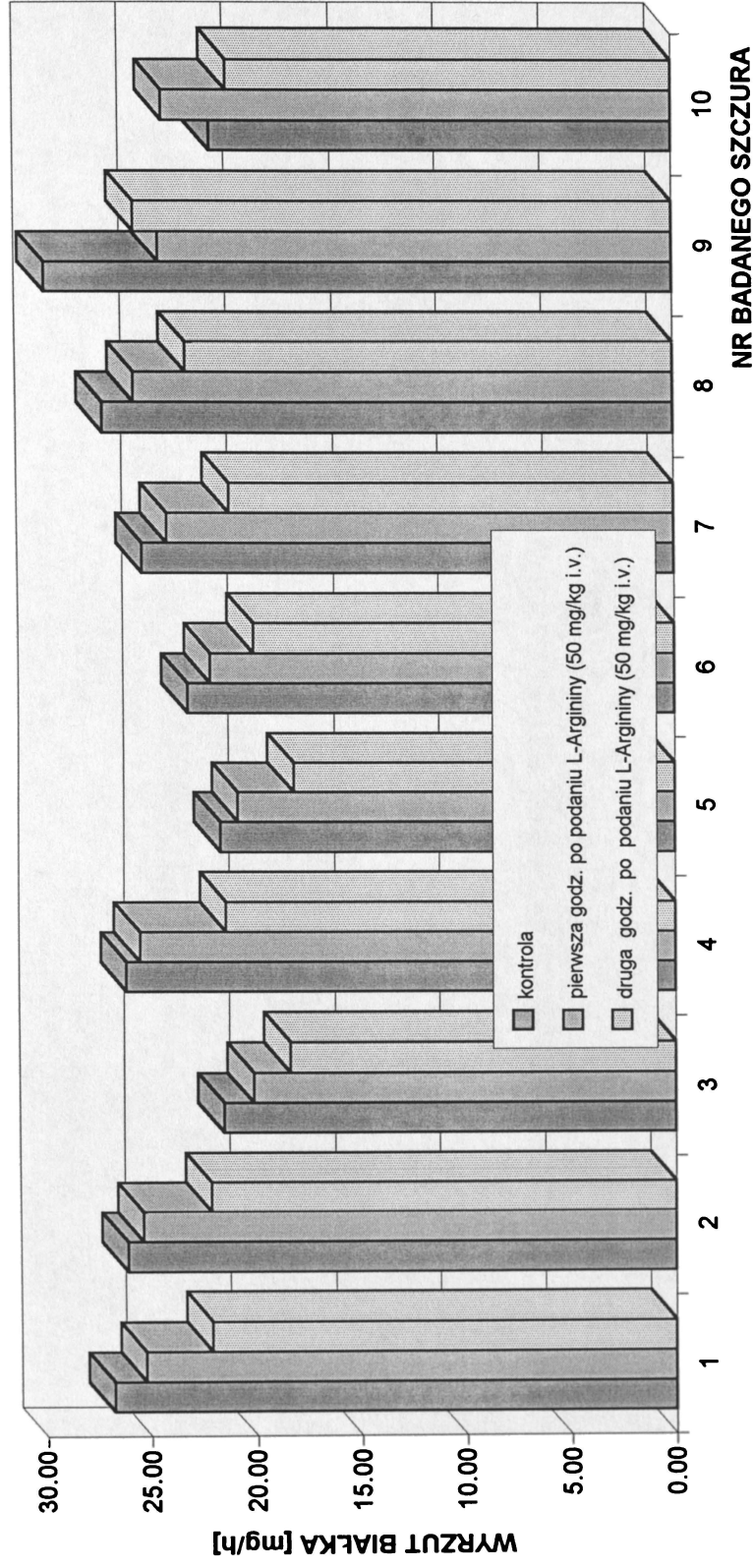
Ryc. 15

**WPLYW L-NNA NA WIELKOŚĆ WYRZUTU BIAŁKA PRZEZ KOMÓRKI
PĘCHERZYKOWE TRZUSTKI W WARUNKACH WYDZIELANIA PODSTAWOWEGO**



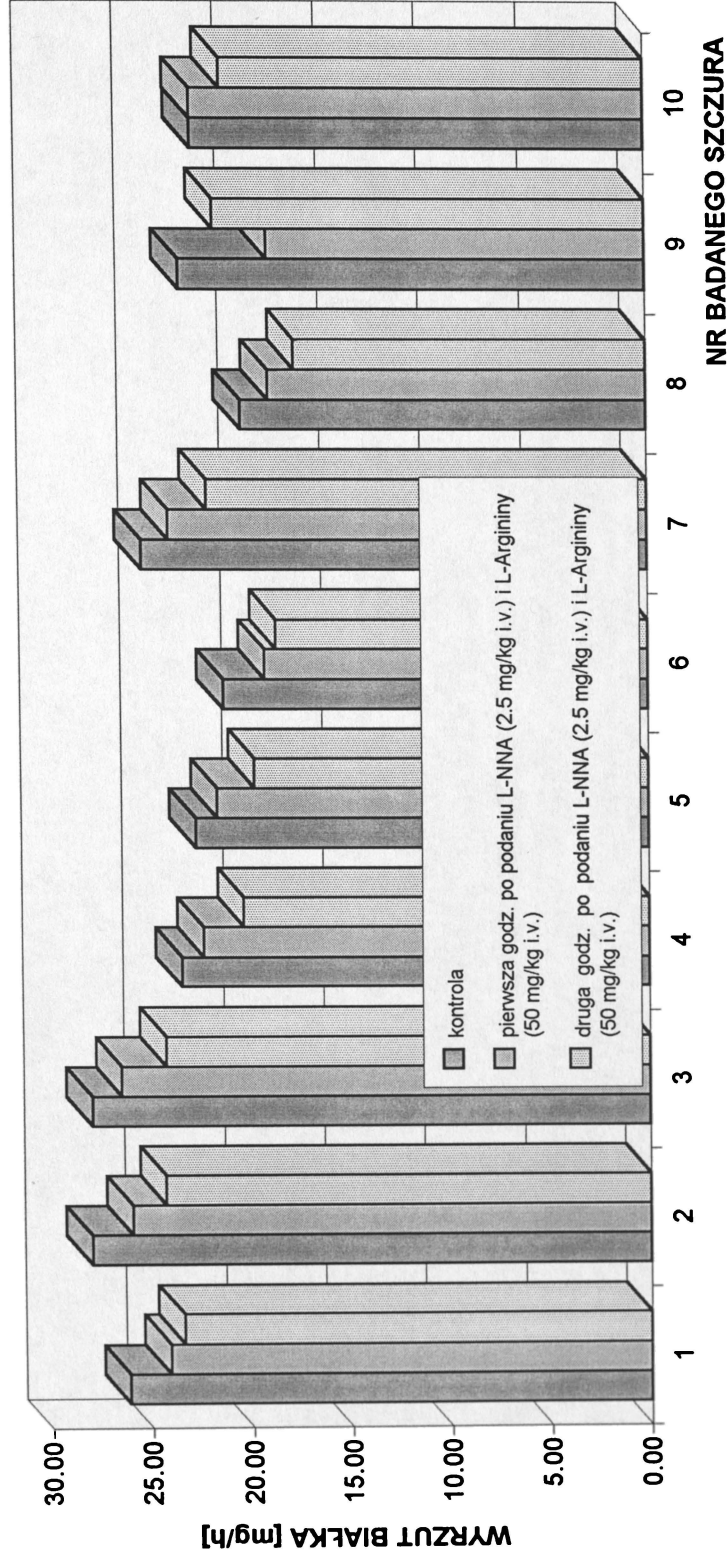
Ryc. 15a

WPLÝW L-ARGININY NA WIELKOŒĆ WYRZUTU BIAŁKA PRZEZ KOMÓRKI
PĘCHERZYKOWE TRZUSTKI W WARUNKACH WYDZIELANIA PODSTAWOWEGO



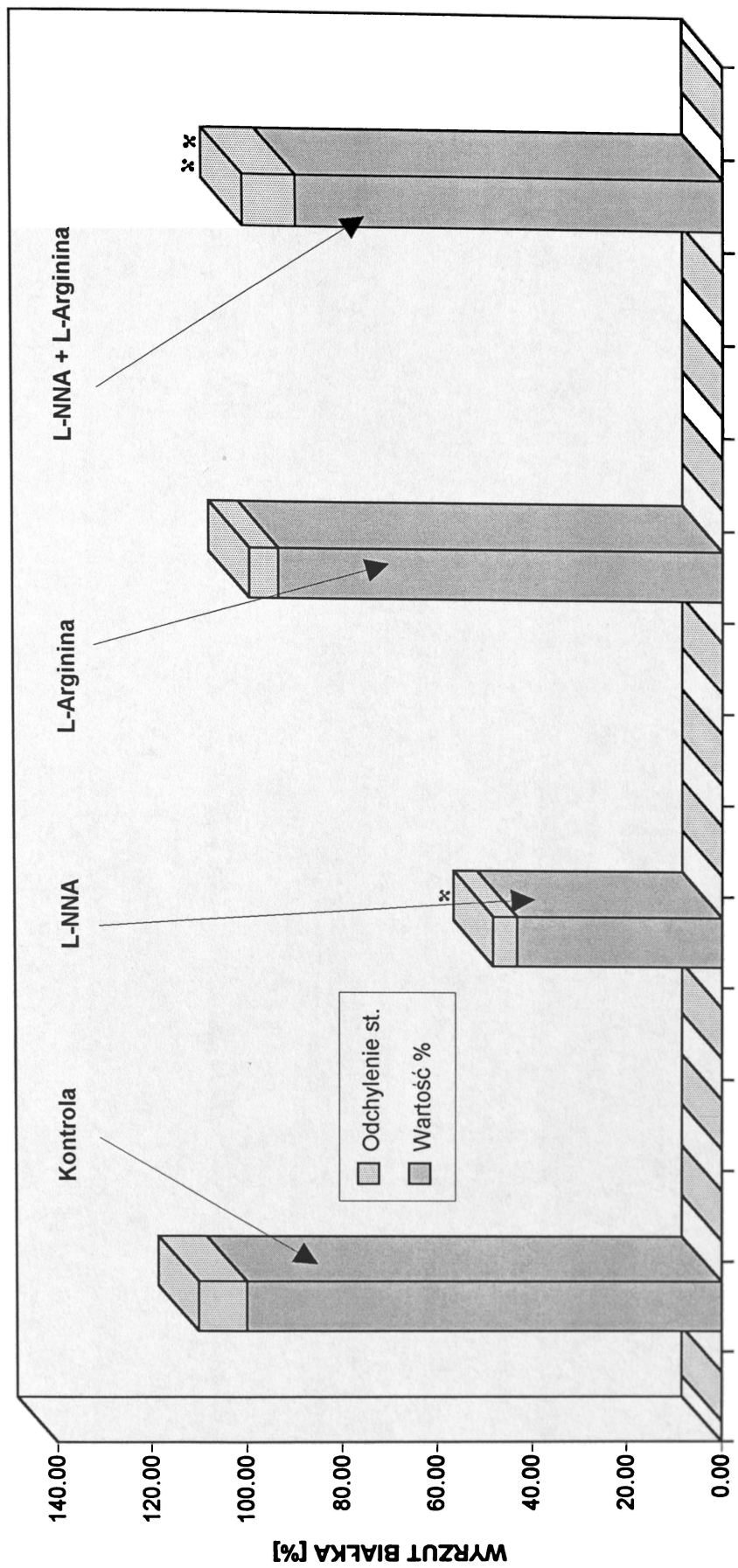
Ryc. 15b

WPLÝW L-NNA I L-ARGININY (kombinacja) NA WIELKOŒĆ WYRZUTU BIAŁKA PRZEZ KOMÓRKI PĘCZERZYKOWE TRZUSTKI W WARUNKACH WYDZIELANIA PODSTAWOWEGO



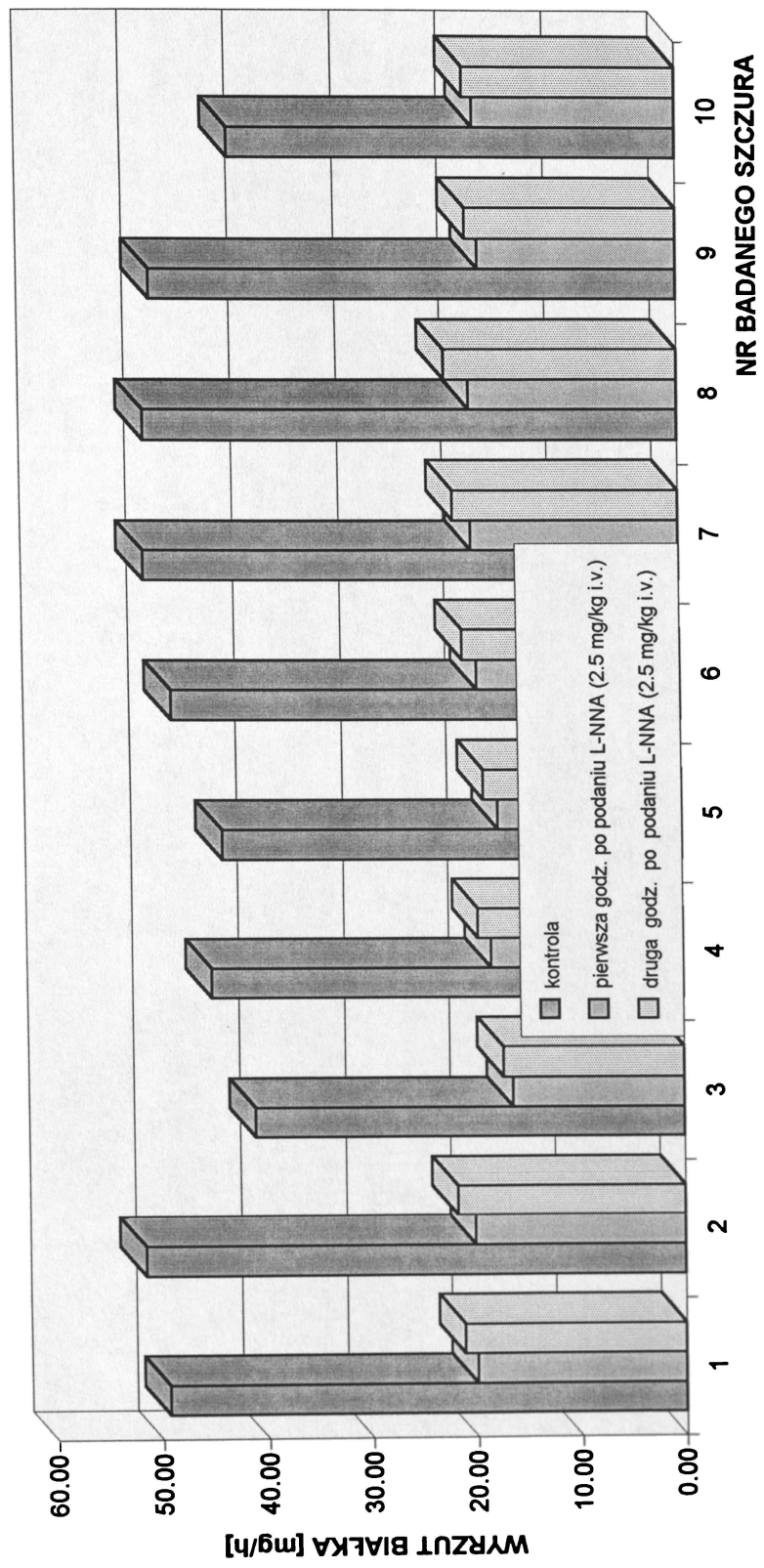
Ryc. 15c

WYDZIELANIE BIAŁKA IN VIVO STYMULOWANE POKARMEM



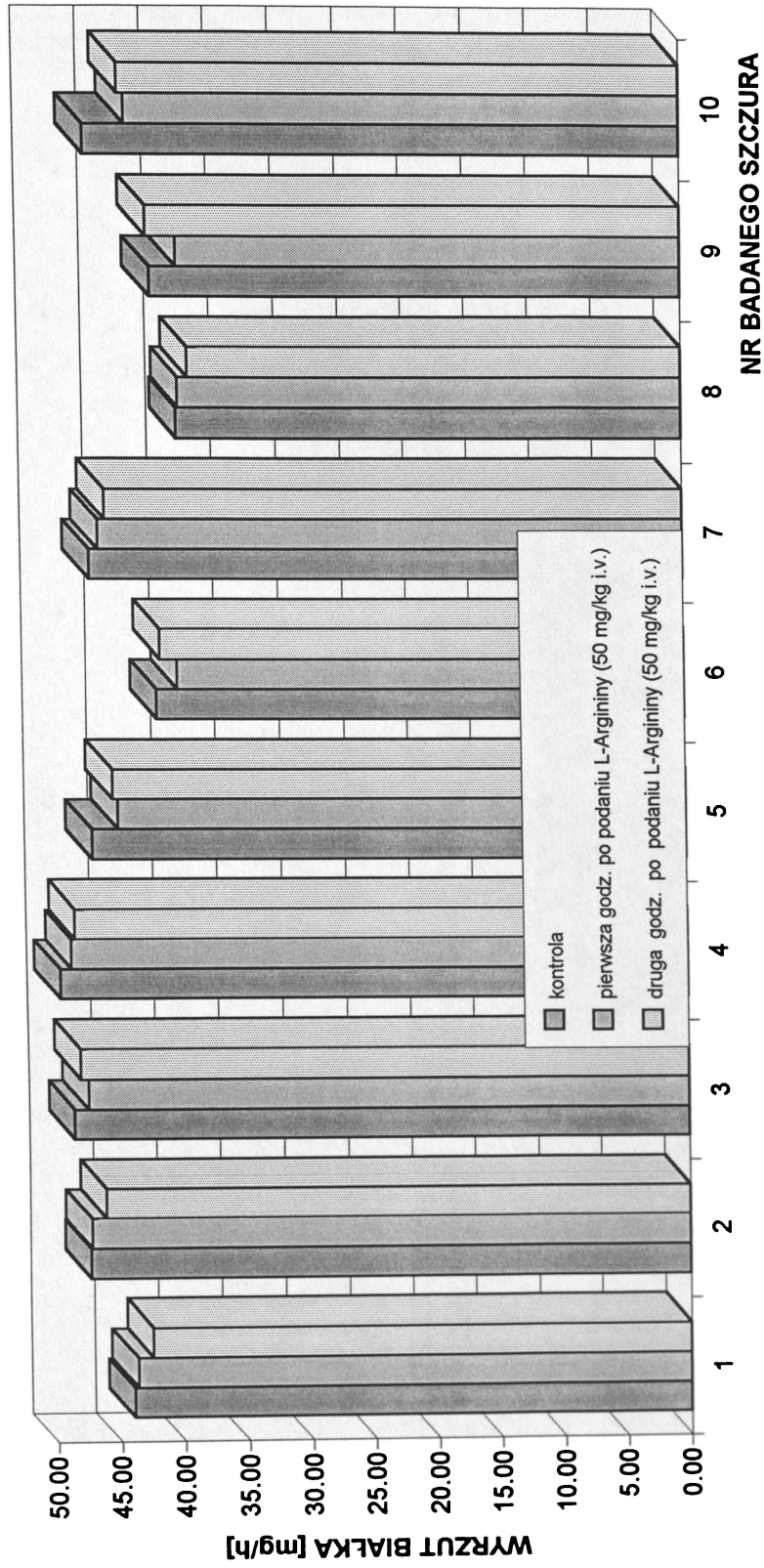
Ryc. 16

ZMIANY W SEKRECJI BIAŁKA TRZUSTKOWEGO SPOWODOWANE PODANIEM L-NNA. WYDZIELANIE TRZUSTKOWE STYMULOWANE POKARMEM.



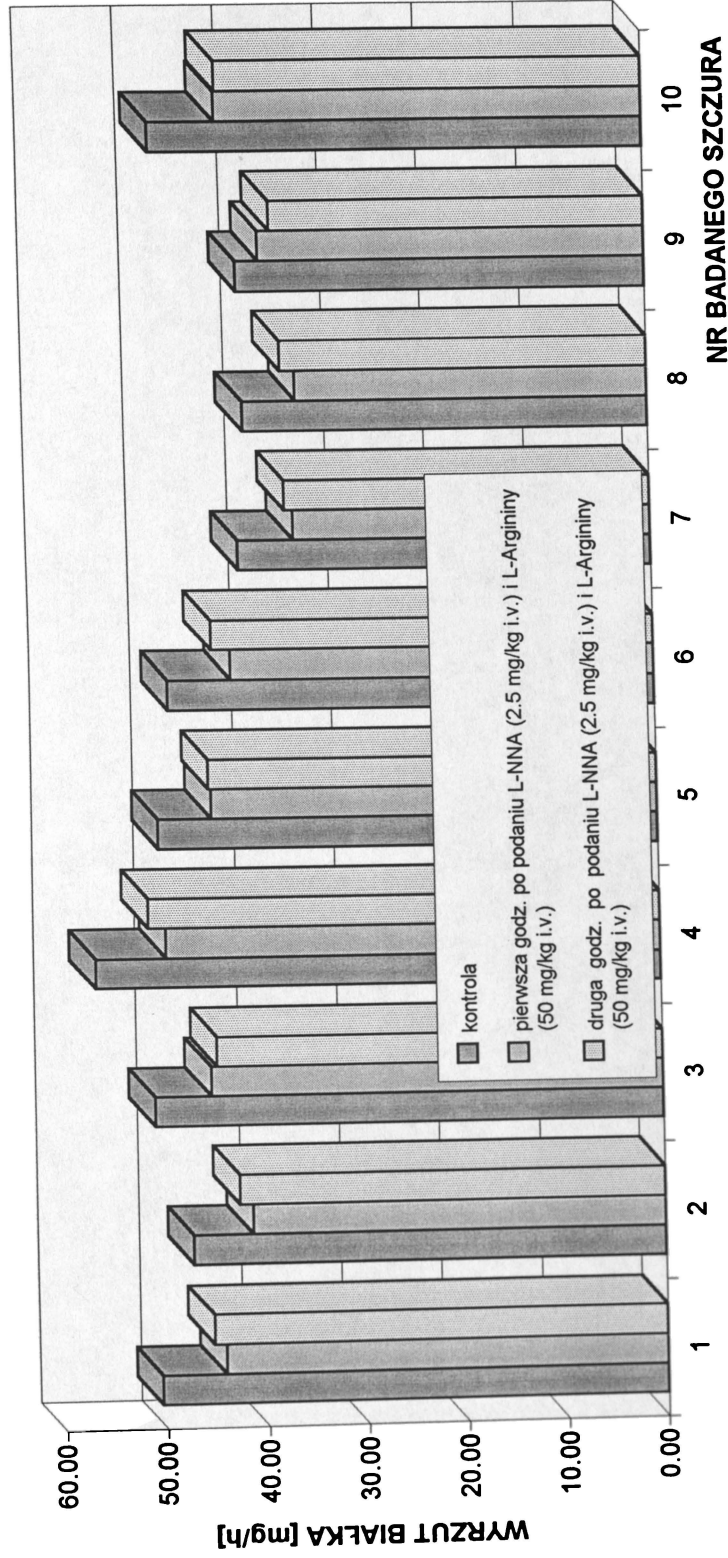
Ryc. 16a

ZMIANY W SEKRECJI BIAŁKA TRZUSTKOWEGO SPOWODOWANE PODANIEM L-ARGININY. WYDZIELANIE TRZUSTKOWE STYMULOWANE POKARMEM.



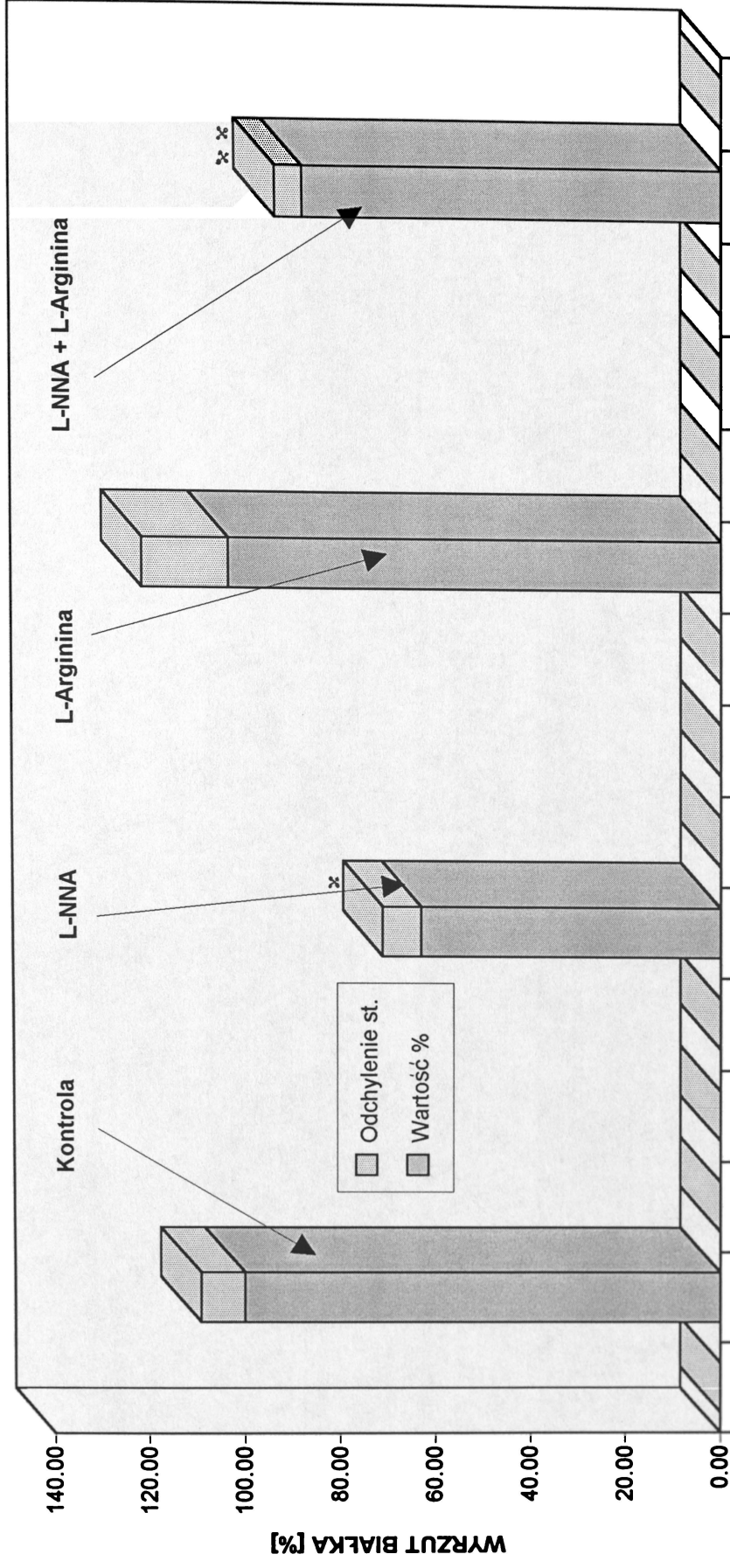
Ryc. 16b

ZMIANY W SEKRECJI BIAŁKA TRZUSTKOWEGO SPOWODOWANE PODANIEM L-NNA I L-ARGININY (kombinacja). WYDZIELANIE TRZUSTKOWE STYMULOWANE POKARMEM.



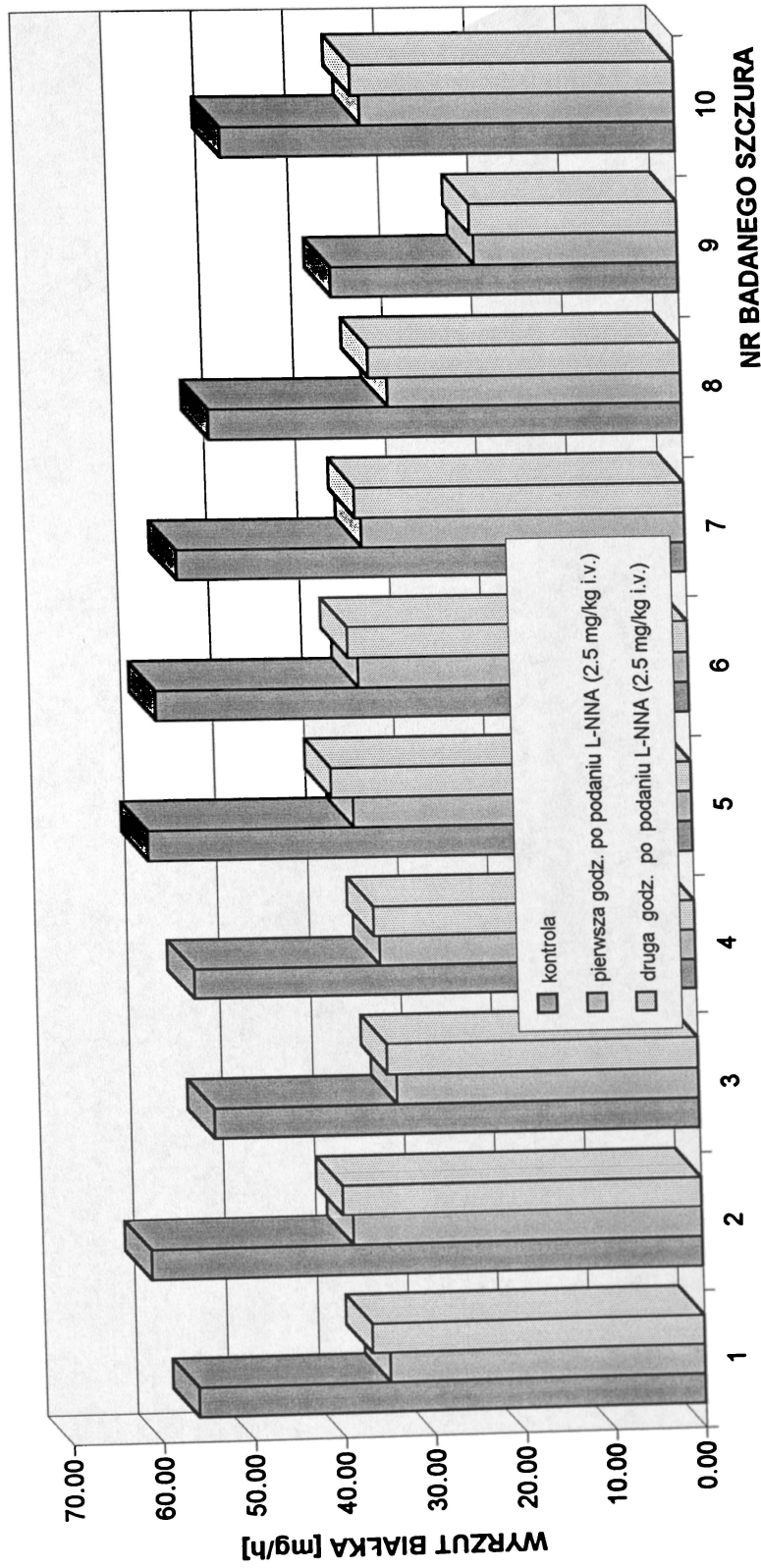
Ryc. 16c

WYDZIELANIE BIAŁKA IN VIVO STYMULOWANE CERULEINĄ



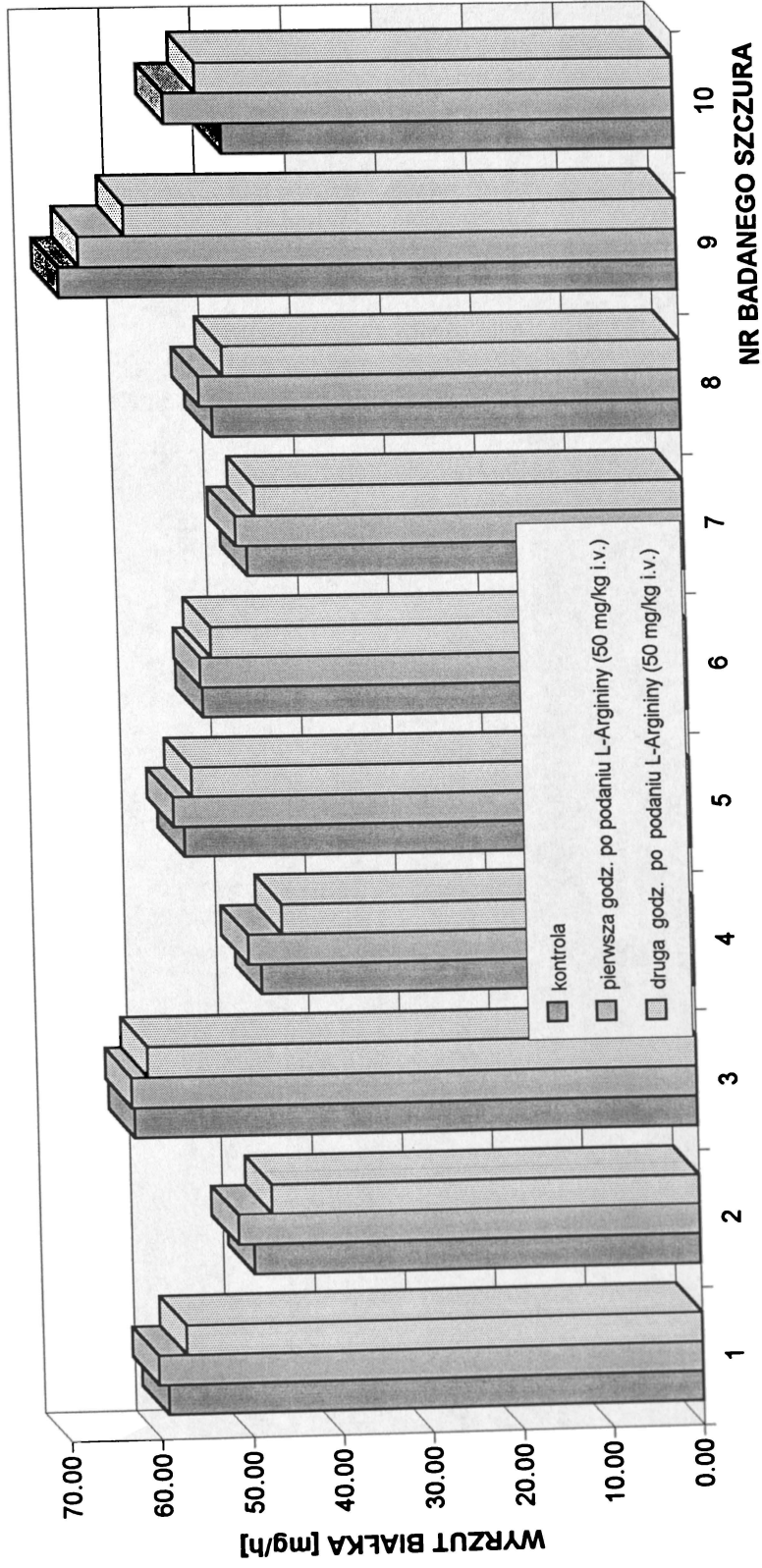
Ryc. 17

WPŁYW L-NNA NA WIELKOŚĆ WYRZUTU BIAŁKA TRZUSTKOWEGO W WARUNKACH WYDZIELANIA STYMULOWANEGO CERULEINĄ.



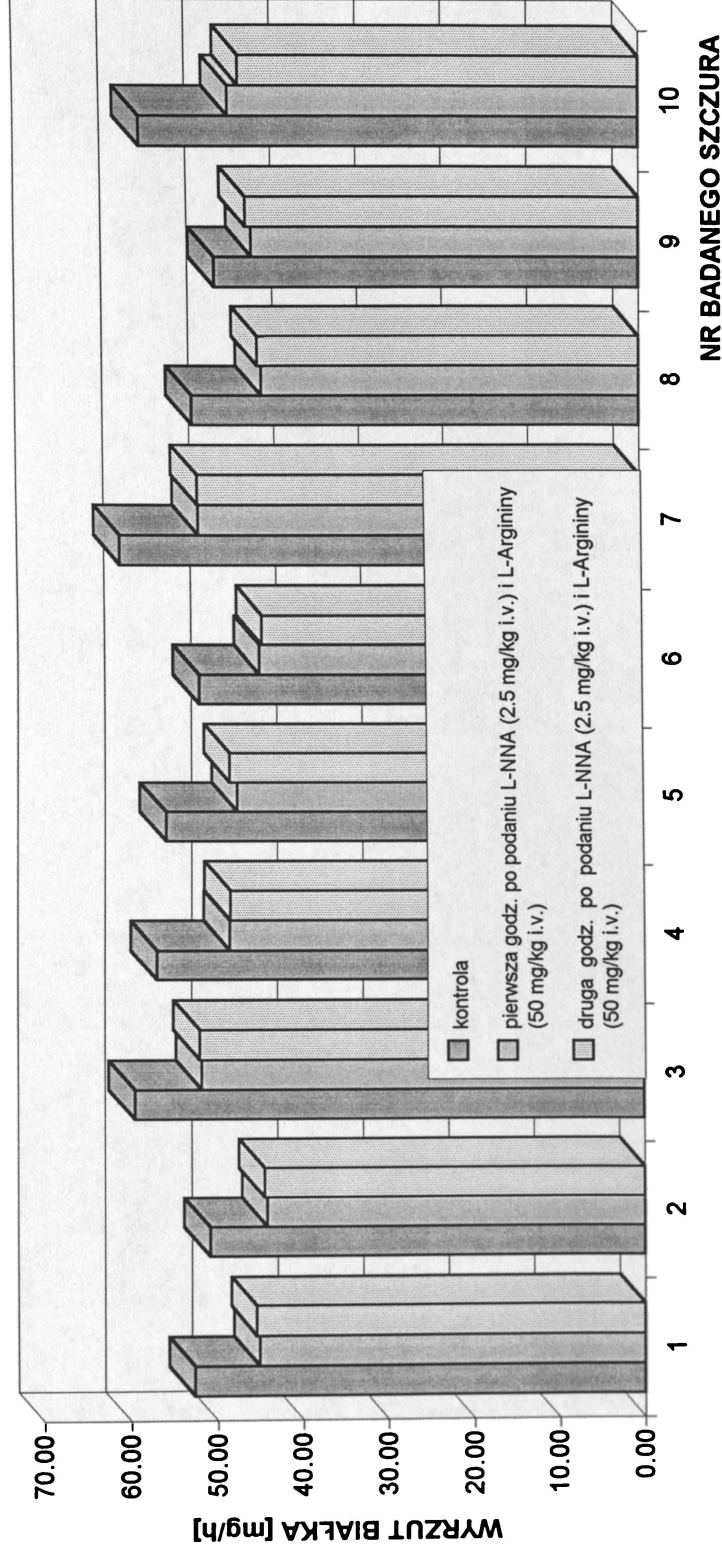
Ryc. 17a

WPLYW L-ARGININY NA WIELKOŚĆ WYRZUTU BIAŁKA TRZUSTKOWEGO W WARUNKACH WYDZIELANIA STYMULOWANEGO CERULEINĄ.



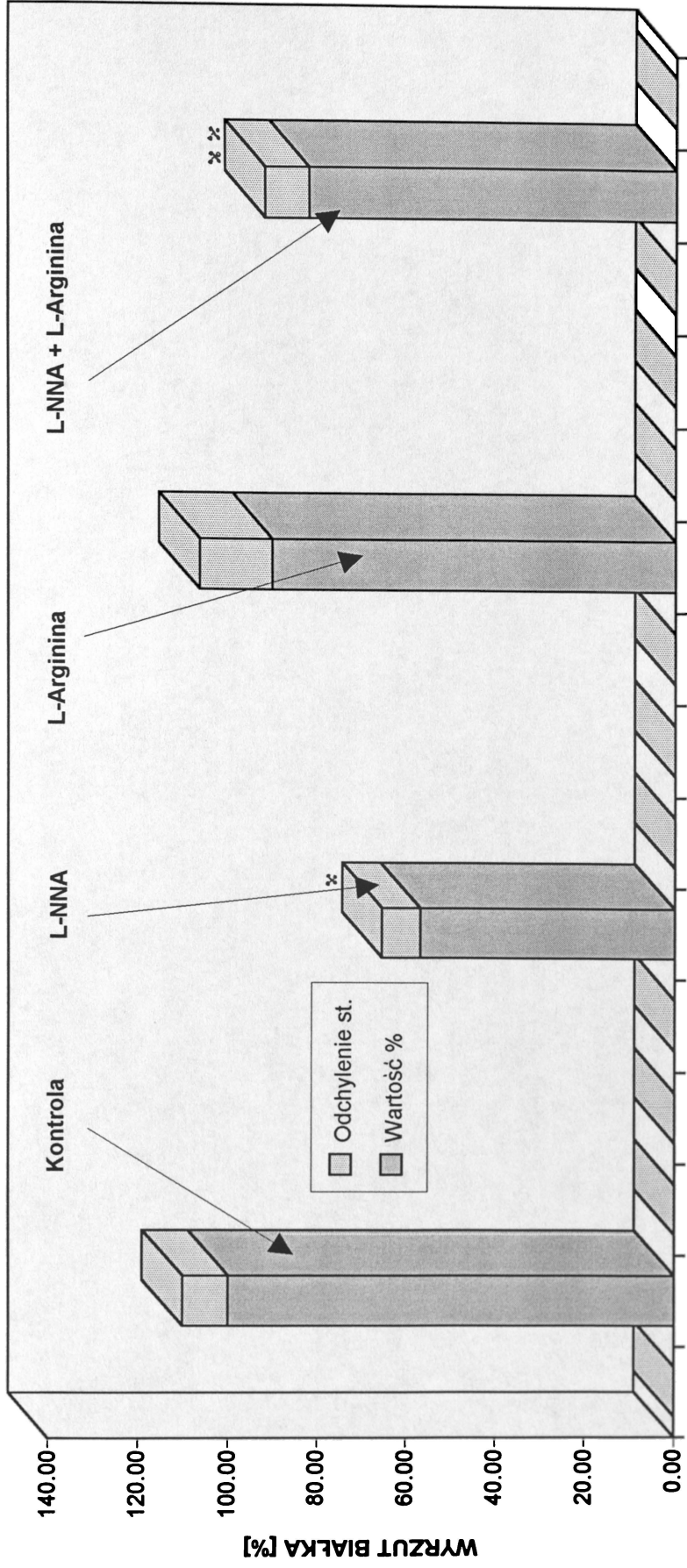
Ryc. 17b

**WPLÝW L-NNA I L-ARGININY (kombinacja) NA WIELKOŒĆ WYRZUTU BIAŁKA
TRZUSTKOWEGO W WARUNKACH WYDZIELANIA STYMULOWANEGO
CERULEINĄ.**



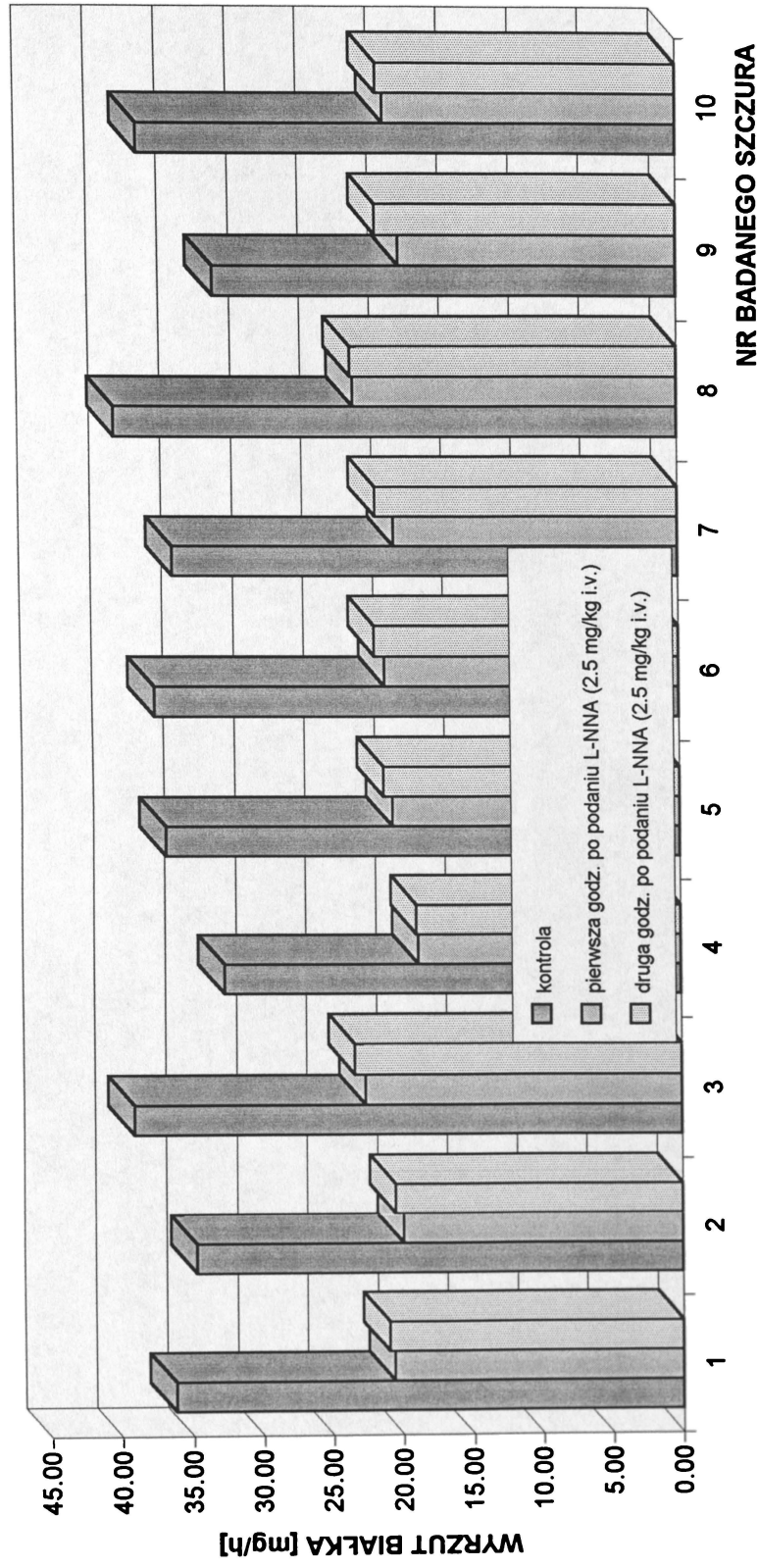
Ryc. 17c

WYDZIELANIE BIAŁKA IN VIVO STYMULOWANE WYPROWADZANIEM SOKU TRZUSTKOWEGO NA ZEWNĄTRZ



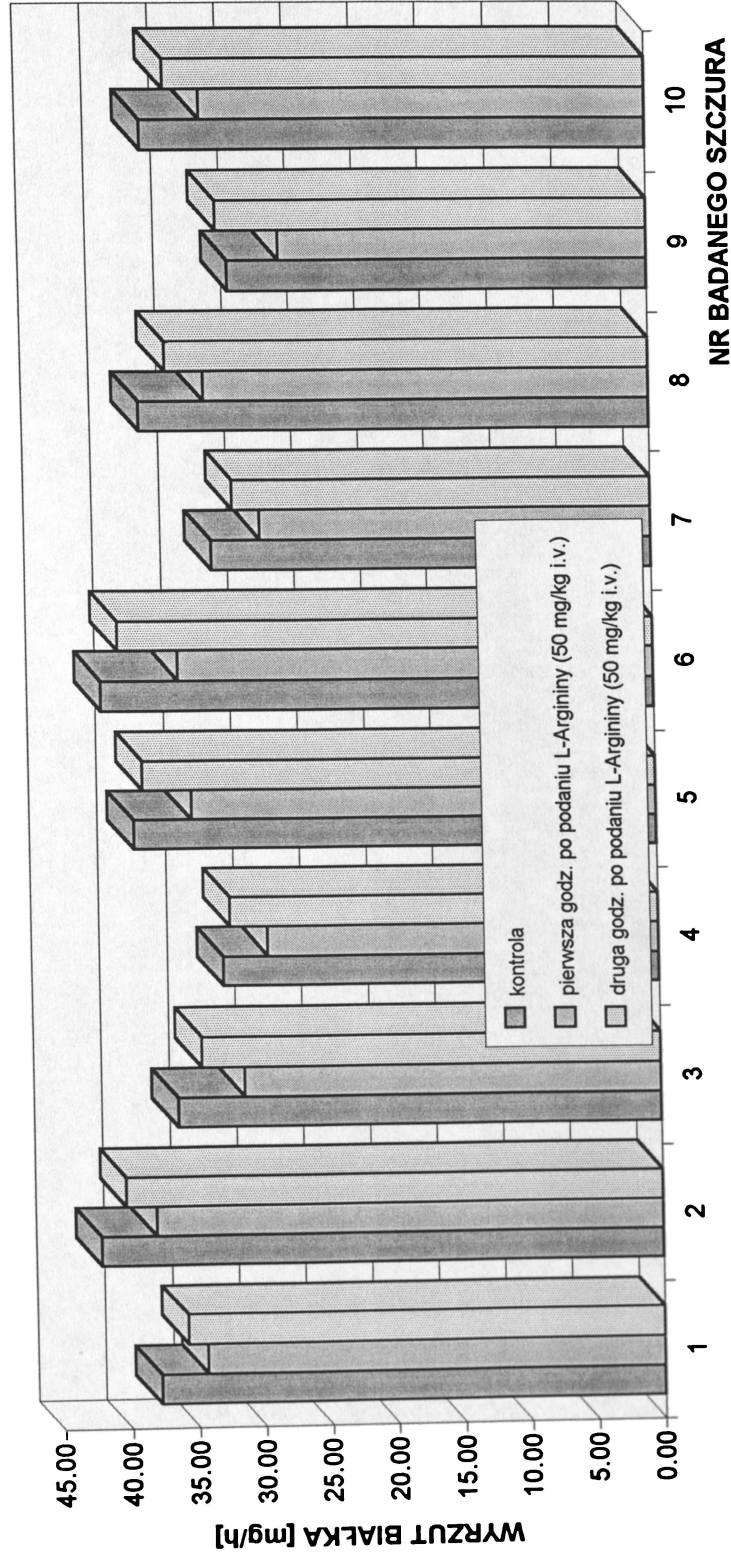
Ryc. 18

WPLÝW L-NNA NA WIELKOŒĆ WYRZUTU BIAŁKA W WARUNKACH WYDZIELANIA STYMULOWANEGO ODPROWADZANIEM SOKU TRZUSTKOWEGO



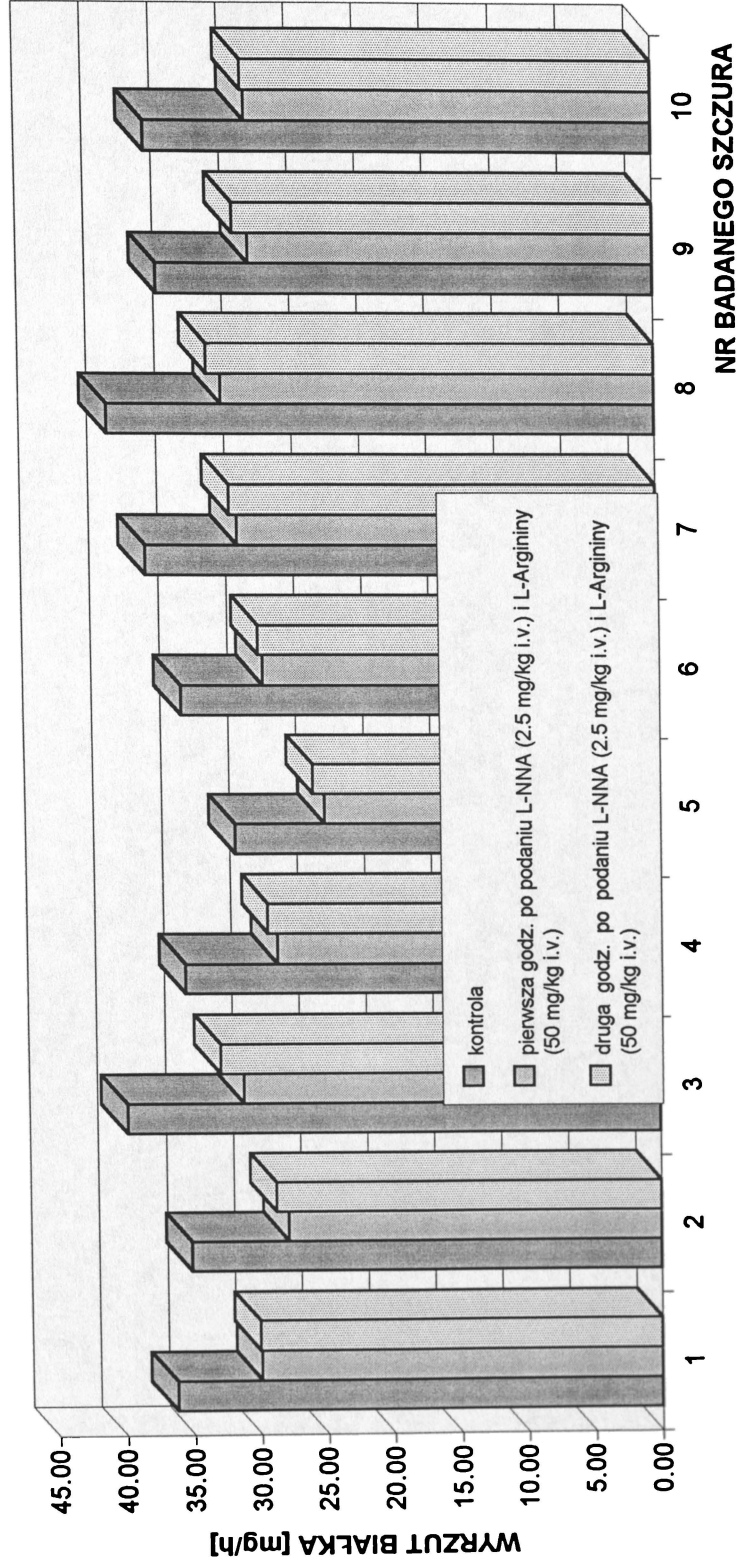
Ryc. 18a

ZMIANA WYRZUTU BIAŁKA TRZUSTKOWEGO SPOWODOWANA PODANIEM L-ARGININY. WYDZIELANIE STYMULOWANE WYPROWADZENIEM SOKU TRZUSTKOWEGO



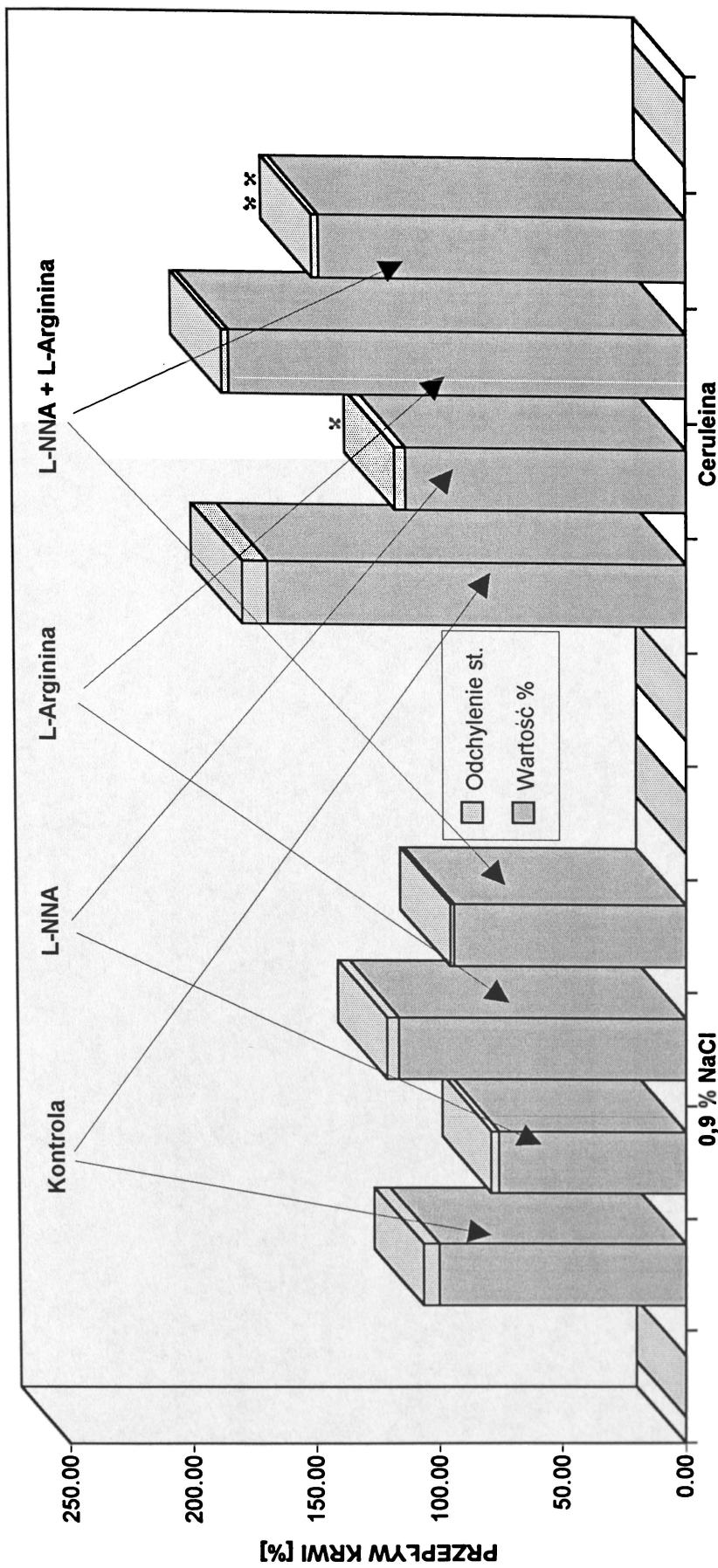
Ryc. 18b

ZMIANA WYRZUTU BIAŁKA TRZUSTKOWEGO SPOWODOWANA PODANIEM L-NNA i L-ARGININY (kombinacja). WYDZIELANIE STYMULOWANE WYPROWADZENIEM SOKU TRZUSTKOWEGO



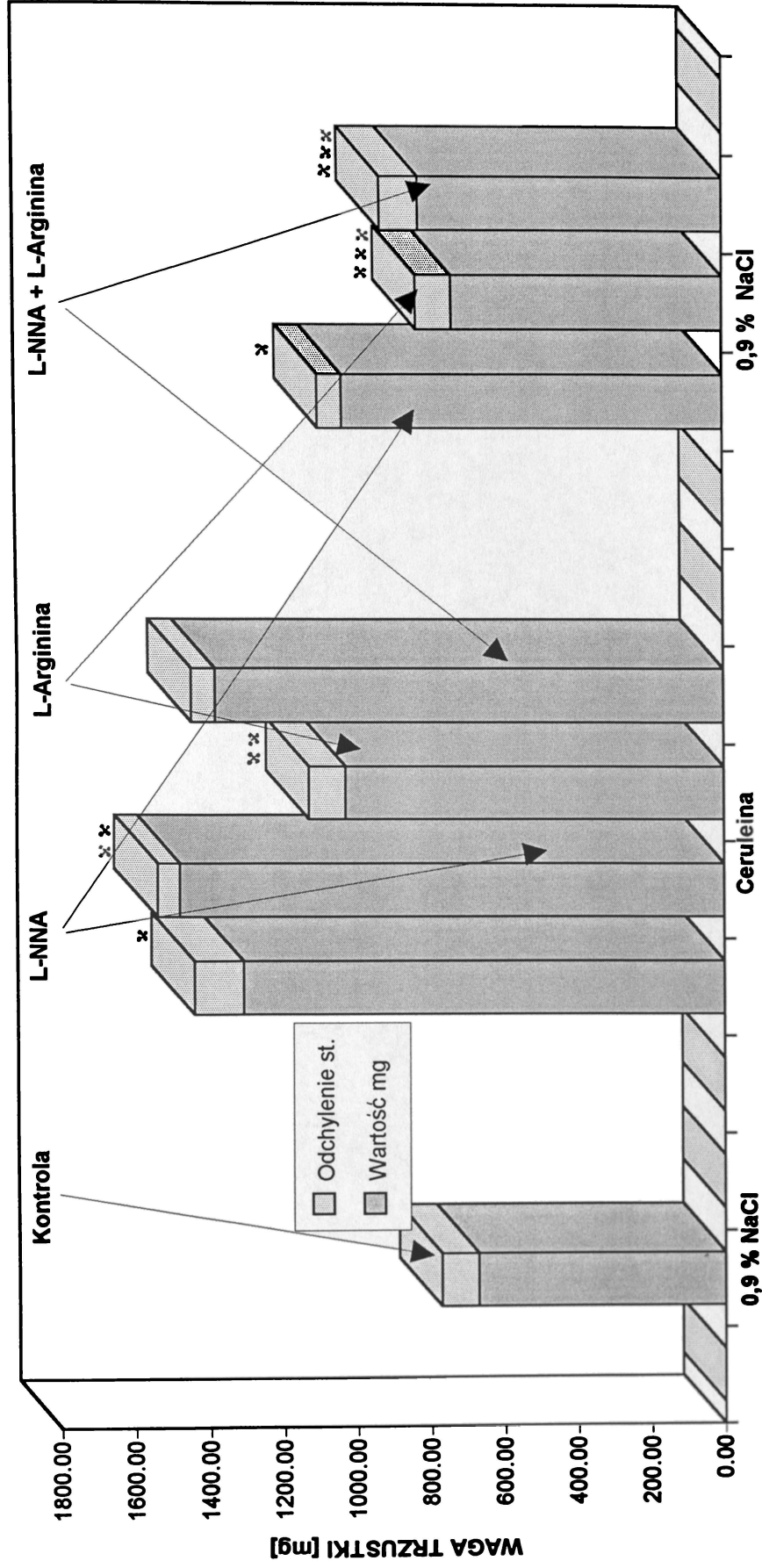
Ryc. 18c

PRZEPŁYW KRWI PRZECZ TRZUSTKĘ W CZASIE WYDZIELANIA PODSTAWOWEGO I STYMULOWANEGO CERULEINĄ



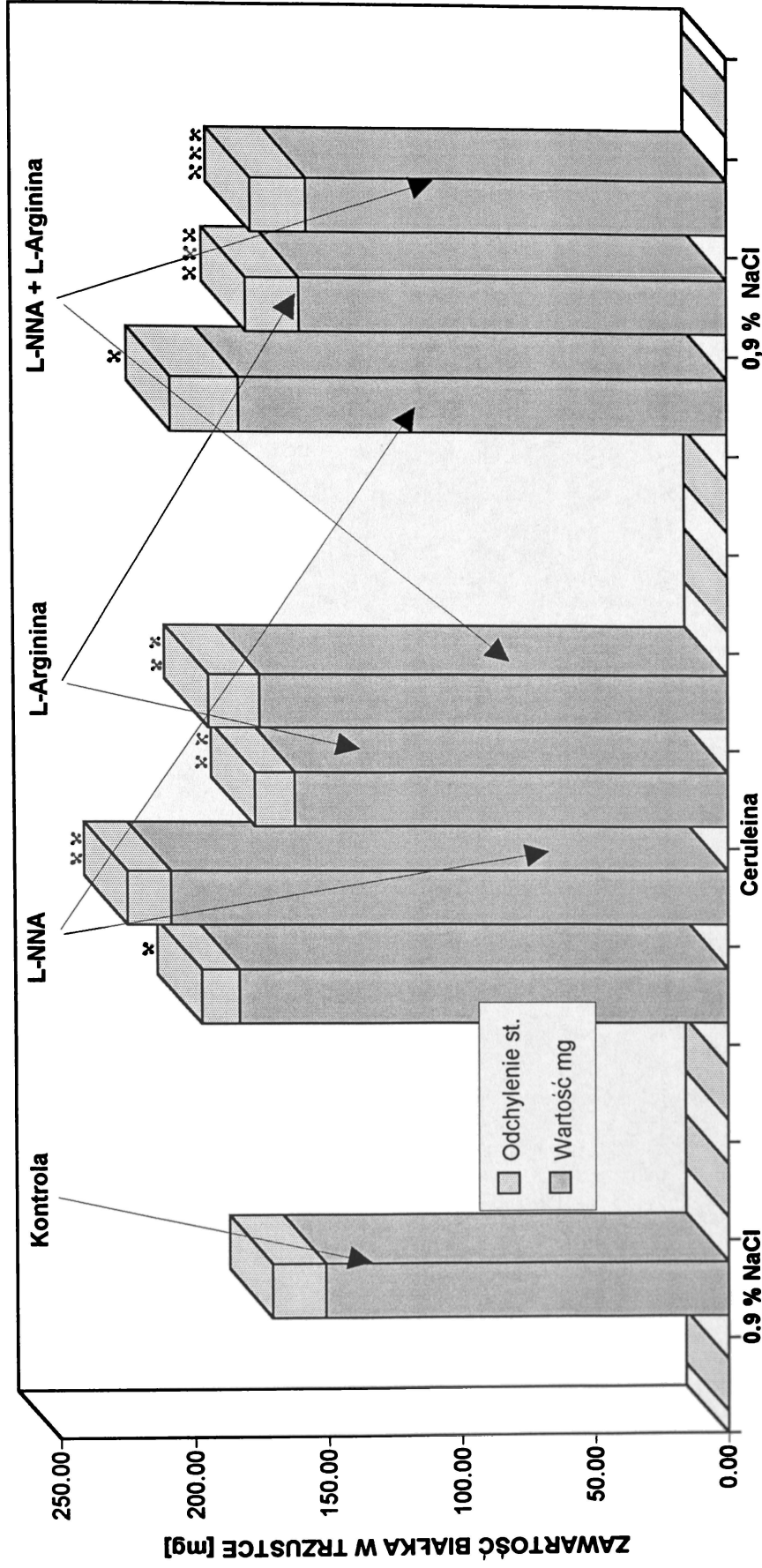
Ryc. 19

CIEŻAR BADANYCH TRZUSTEK



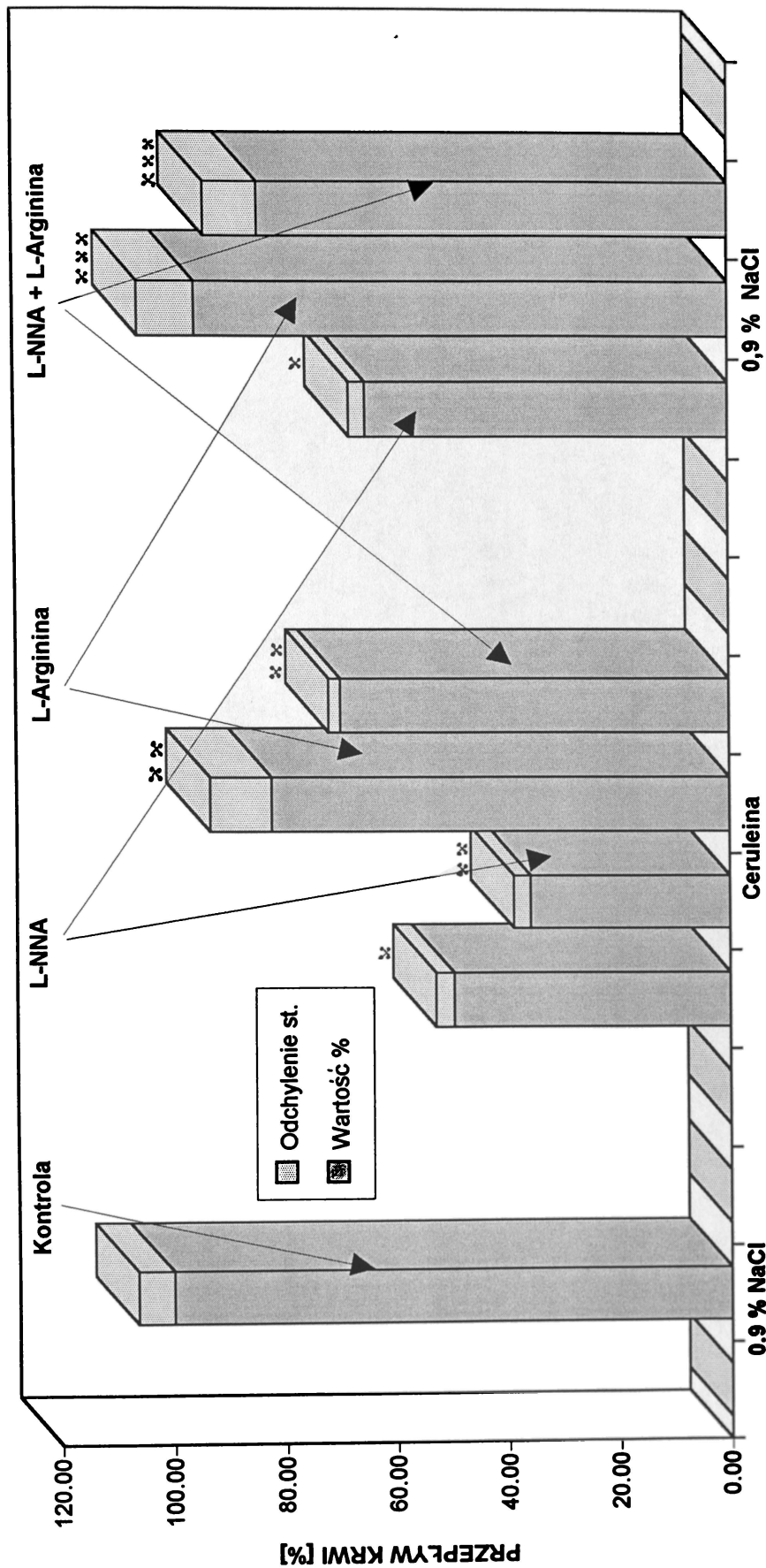
Ryc. 20

ZAWARTOŚĆ BIAŁKA W BADANYCH TRZUSTKACH



Ryc. 21

PRZEPŁYW KRWI PRZECZ TRZUSTKĘ



Ryc. 22

TABELA 1

Wydzielanie amylazy [U/h] *in vivo* w warunkach podstawowych i stymulowanych (pokarmem, ceruleiną-0.5 ug/kg/h, wyprowadzaniem soku trzustkowego na zewnątrz). Zmiany po podaniu L-NNA (2.5 mg/kg i.v.), L-argininy (50 mg/kg i.v.) lub ich kombinacji w trakcie trzygodzinnych doświadczeń (iniekcji dokonywano pomiędzy pierwszą a drugą godziną). Każdy test przeprowadzono na około 10 szczurach. *oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do kontroli przy $p < 0,05$. **oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do wartości otrzymanych w teście z L-NNA przy $p < 0,05$.

WYDZIELANIE AMYLAZY [U/h]				
	podstawowe	pokarm	ceruleina	wyprowadzanie soku trzustkowego
kontrola	6028 $\pm$ 1388	16456 $\pm$ 4867	14237 $\pm$ 1230	12960 $\pm$ 3610
L-NNA	5112 $\pm$ 1207	9182 $\pm$ 1045 *	7122 $\pm$ 1209 *	8644 $\pm$ 1431 *
L-Arg	5606 $\pm$ 1431	17114 $\pm$ 2167	13561 $\pm$ 1057	12901 $\pm$ 1200
L-NNA +				
L-Arg	6088 $\pm$ 1007	13279 $\pm$ 1865 **	11561 $\pm$ 2060 **	12065 $\pm$ 1315 **

TABELA 2

Oznaczanie aktywności amylazy [% całkowitego wyrzutu] uwolnionej z izolowanych pęcherzyków trzustkowych w warunkach podstawowych i stymulowanych (CCK-8 : 10^{-12} M, urecholina : 10^{-5} M). Do płynu inkubacyjnego dodawano L-NNA, L-argininę lub ich kombinację we wzrastających koncentracjach (10^{-5} - 10^{-3} M). Każdy test przeprowadzono na 2 szczurach. Statystyczną znamienność wyników oznaczono w odniesieniu do kontroli przy $p < 0,05$.

WYDZIELANIE AMYLAZY [% kontroli]			
	podstawowe	CCK-8 (10^{-12} M)	urecholina (10^{-5} M)
kontrola	4.6 ± 0.5	12.2 ± 1.3	11.7 ± 0.6
L-NNA 10^{-5} M	3.7 ± 1.0	11.4 ± 2.0	12.3 ± 1.9
10^{-4} M	3.1 ± 0.3	12.3 ± 1.1	11.3 ± 1.4
10^{-3} M	2.7 ± 0.4	11.8 ± 2.0	10.5 ± 1.7
L-Arg 10^{-5} M	4.6 ± 0.4	10.8 ± 1.0	10.2 ± 0.6
10^{-4} M	5.5 ± 1.5	9.5 ± 1.7	11.2 ± 1.7
10^{-3} M	4.1 ± 0.1	10.8 ± 1.0	10.4 ± 1.8
L-NNA 10^{-3} M + L-Arg 10^{-3} M	4.2 ± 0.5	11.2 ± 2.0	10.7 ± 1.2

TABELA 3

Zmiany histologiczne w postaci obrzęku, nacieku leukocytów i wakuolizacji komórek pęcherzykowych wywoływane: 5-godz infuzją 0.9% NaCl s.c.; 5-godz infuzją ceruleiny (10 $\mu\text{g/kg/h}$) s.c.; 5-godz infuzją ceruleiny (10 $\mu\text{g/kg/h}$) s.c. poprzedzoną iniekcją L-NNA (20 mg/kg i.v.), L-argininy (100 mg/kg i.v.) lub ich kombinacji; 5-godz infuzją 0.9% NaCl s.c. poprzedzoną iniekcją L-NNA (20 mg/kg i.v.), L-argininy (100 mg/kg i.v.) lub ich kombinacji. Każdy test przeprowadzono na 6-8 szczurach. *oznacza statystyczną znamienność wyników w odniesieniu do wartości otrzymanych w teście z ceruleiną przy $p < 0,05$. **oznacza statystyczną zaniennosć wyników w odniesieniu do wartości otrzymanych w teście z ceruleiną + L-NNA przy $p < 0,05$.

	ZMIANY HISTOLOGICZNE		
	obrzęk (0-3)	naciek (0-3)	wakuolizacja (0-3)
kontrola	0	0	0
ceruleina	1.50 ± 0.13	1.25 ± 0.26	1.30 ± 0.18
ceruleina + L-NNA	$2.80 \pm 0.22^*$	$1.75 \pm 0.14^*$	$1.68 \pm 0.17^*$
ceruleina + L-Arg	$1.00 \pm 0.15^*$	$0.75 \pm 0.12^*$	$0.60 \pm 0.10^*$
ceruleina +			
L-NNA + L-Arg	$2.00 \pm 0.14^{**}$	$1.14 \pm 0.12^{**}$	$0.95 \pm 0.21^{**}$
L-NNA	1.18 ± 0.14	0.74 ± 0.14	0
L-Arg	0.28 ± 0.10	0	0
L-NNA + L-Arg	0.24 ± 0.05	0	0

D Y S K U S J A

Efektem zewnątrzwydzielniczej aktywności trzustki jest produkcja i wydzielanie przede wszystkim enzymów, niezbędnych do prawidłowego trawienia i wchłaniania składników pokarmowych. Sok trzustkowy zawierający wodę i elektrolity wydzielane przez komórki śródpecherzykowe i przewodowe oraz enzymy, których źródłem są komórki pecherzykowe wydzielany jest nie tylko pod wpływem pobudzających bodźców pokarmowych ale także przy ich braku w okresie międzytrawiennym.

W zależności od miejsca będącego źródłem czynników stymulujących odpowiedź sekrecyjną trzustki na pokarm podzielono na trzy fazy: głowową, żołądkową i jelitową przyjmując równocześnie, że jest to umowne, gdyż powyższe fazy wzajemnie na siebie zachodzą lub występują jednocześnie [2].

Pokarm działa stymulująco na trzustkę poprzez szereg mechanizmów, z których kluczową rolę przypisuje się mechanizmom nerwowym i hormonalnym oraz ścisłej interakcji pomiędzy nimi. Regulacja nerwowa wydzielania trzustkowego związana jest przede wszystkim ze stymulacją nerwów błędnych, która w fazie głowowej jest pochodzenia ośrodkowego natomiast w żołądkowej i jelitowej pochodzenia obwodowego. Treść żołądkowa przechodząc do dwunastnicy powoduje z kolei uwalnianie hormonów jelitowych głównie cholecystokininy, sekretyny i neurotensyny, które wykazują silne działanie stymulujące na trzustkę [28].

Zewnątrzwydzielnicza aktywność trzustki zależy nie tylko od czynników nerwowych i hormonalnych będących bezsprzecznie wiodącymi ale także od innych mechanizmów, którym przypisuje się pewne znaczenie w kontroli wydzielania trzustkowego. Przede wszystkim należy nadmienić o roli proteaz trzustkowych, które na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego modyfikują aktywność trzustki. W ich działaniu regulacyjnym pośredniczą, w zależności od gatunku, takie substancje jak: cholecystokina, sekretyna, neurotensyna [30,32-39]. Ponadto prawdopodobnie również kwasy żółciowe spełniają funkcję śródjelitowych modulatorów sekrecji enzymów trawiennych poprzez różnorodne mechanizmy zapobiegające przedwczesnej inhibicji popokarmowego wydzielania trzustkowego [30].

Badania przeprowadzone w ciągu ostatnich lat sugerują istnienie różnych neuromodulatorów wpływających na funkcjonowanie wydzielniczych elementów trzustki. Przypuszcza się, że jednym z takich czynników jest tlenek azotu. Wykorzystując substrat syntazy tlenu azotu jakim jest półpodstawowy aminokwas L-arginina oraz selektywny bloker NOS L-NNA, przeprowadziłam szereg doświadczeń mających na celu określenie roli NO w regulacji sekrecji trzustki. Rezultaty sugerują, że NO modyfikuje wydzielanie trzustkowe ale tylko w warunkach *in vivo*, gdyż w eksperymentach *in vitro* przeprowadzonych na izolowanych pęcherzykach nie zaobserwowano żadnego efektu jego działania.

W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach z przewlekłymi przetokami trzustkowymi stwierdzono, że hamowanie syntazy NO przez L-NNA wywiera niewielki wpływ na podstawową sekrecję. Równoczesne podanie L-argininy odwraca niemal całkowicie działanie L-NNA przywracając wielkość wyrzutu białka i amylazy do wartości kontrolnych.

Zastosowanie L-NNA u szczurów, u których sekrecja była stymulowana pokarmem, ceruleiną lub wyprowadzaniem soku trzustkowego na zewnątrz spowodowało znacznego stopnia zmniejszenie wartości badanych parametrów określających aktywność trzustki. Wyrzut protein, który uległ prawie dwukrotnemu zwiększeniu w wyniku działania bodźców pokarmowych zmniejszył się o około 60% po zablokowaniu enzymu syntezującego tlenek azotu. Takie zmiany dotyczyły także wydzielania amylazy. Sekrecja białek i amylazy stymulowana wyprowadzaniem soku na zewnątrz również uległa zahamowaniu w 60% pod wpływem L-NNA, a wydzielanie poceruleinowe spadło o około 37%. W powyższych grupach hamujący efekt L-NNA na wielkość wyrzutu białek i amylazy trzustkowej uległ częściowemu lub prawie całkowitemu odwróceniu przy równoczesnym podaniu z L-NNA substratu dla produkcji NO, czyli aminokwasu L-argininy. Dożylne stosowanie samej L-argininy nie modyfikowało w sposób znamienny wielkości sekrecji trzustkowej w warunkach podstawowych i stymulowanych u zwierząt z przewlekłymi przetokami trzustkowymi.

Podobne obserwacje pochodzą z badań Molero i Malagelady, którzy po podaniu szczurom z przetokami trzustkowymi L-NAME

otrzymali redukcję wyrzutu amylazy w warunkach podstawowych i stymulowanych ceruleiną. Efekt ten uległ częściowemu odwróceniu po podaniu L-argininy [105]. Konturek i wsp. stwierdzili, że u psów popokarmowy i hormonalnie pobudzany wzrost sekrecji trzustkowej ulega także znacznemu osłabieniu po zablokowaniu przez L-NNA produkcji endogennego NO [106].

Mechanizm działania NO, uwolnionego z L-argininy, na zewnątrzwydzielniczą funkcję trzustki nie jest wyjaśniony. Trzustkowa odpowiedź na odprowadzanie soku czy karmienie u szczurów, przynajmniej w części zachodzi przy udziale hormonów jelitowych, szczególnie cholecystokininy. W związku z tym efekt supresji syntazy NO przez L-NNA mógłby być związany ze zmianą uwalniania tych hormonów, tym bardziej że w doświadczeniach przeprowadzonych na psach popokarmowy wzrost stężenia gastryny i CCK w osoczu uległ znacznej redukcji pod wpływem L-NNA [106]. Taka możliwość została wzięta pod uwagę przy porównywaniu efektu działania L-NNA na wydzielanie pobudzone endogenną cholecystokininą uwalnianą pod wpływem pokarmu czy odprowadzania soku trzustkowego z efektem działania L-NNA na wydzielanie pobudzone ceruleiną. W obu przypadkach hamowanie syntezy NO spowodowało podobną redukcję sekrecji, która wracała całkowicie lub częściowo do wartości wyjściowych wyłącznie po zastosowaniu L-argininy. Wynika z tego, że spadek sekrecji białka przez komórki pęcherzykowe nie jest powiązany wyłącznie z hamowaniem wydzielania hormonów jelitowych.

Pobudzanie zewnątrzwydzielniczych elementów trzustki

przez pokarm związane jest nie tylko z mechanizmami hormonalnymi, ale także nerwowymi. W związku z tym hamowanie popokarmowego wydzielania białka trzustkowego przez L-NNA może sugerować, że endogenne NO pośredniczy w aktywacji komórek sekrecyjnych przez nerwy błędne. W badaniach, w których podawano psom L-NNA otrzymano redukcję wyrzutu enzymów trzustkowych w warunkach stymulacji popokarmowej oraz rzekomego karmienia, gdzie aktywność nerwów błędnych jest dominującym mechanizmem regulującym wydzielanie trzustkowe [106].

Holst badając rolę NO w egzokrynnej sekrecji trzustki pobudzał elektrycznie nerwy błędne w izolowanych, perfundowanych trzustkach świni. Odpowiedź trzustki na pobudzenie nerwowe oraz infuzję VIP uległa zahamowaniu po zastosowaniu L-NAME. Zarówno L-arginina jak nitroprusydek sodowy, egzogenne donory NO, znosiły hamujące działanie L-NAME [107].

W doświadczeniach z użyciem inhibitora syntazy NO i L-argininy przeprowadzonych na izolowanych pęcherzykach trzustkowych wykazano, że ani pod wpływem L-NNA, ani też L-argininy, nie ulega zmianie sekrecja amylazy w warunkach podstawowych, lub stymulowanych CCK-8 czy urecholina. W związku z tym można sądzić, że NO obecny w tkance trzustkowej nie pochodzi z komórek sekrecyjnych, oraz że spadek wydzielania powstający po zablokowaniu syntazy NO zależy nie tyle od bezpośredniego wpływu produktu tej syntazy na trzustkę, ale od efektu pośredniego obserwowanego wyłącznie *in vivo*. Prawdopodobnie endogenne NO

azotu kontroluje podstawową i stymulowaną zewnątrzwydzielniczą aktywność trzustki poprzez modyfikowanie wielkości trzustkowego przepływu krwi.

Przepływ krwi traktowany jest jako bardzo istotny czynnik regulujący wydzielanie trzustkowe [108]. Poprzednie badania związane z zastosowaniem ADH [108], leukotrienu C4 [64], PYY [65] wykazały, że zmniejszeniu przepływu krwi przez naczynia trzustkowe towarzyszył spadek wydzielania trzustkowego. Podając bloker NOS otrzymałam nie tylko spadek wyrzutu białka w eksperymentach *in vivo* ale także znaczną redukcję przepływu wynoszącą przy wydzielaniu podstawowym około 30% a przy stymulowanym ceruleiną około 55%. Ponadto hamujące działanie L-NNA ulegało odwróceniu po L-argininie. Podobnie Molero i Malagelada zaobserwowali, że L-NAME nie tylko zmniejsza wyrzut amylazy ale i podnosi systemowe ciśnienie tętnicze [106]. W badaniach przeprowadzonych w Instytucie Fizjologii psom podawano L-NNA uzyskując niewielkiego stopnia zmianę przepływu krwi, gdy równocześnie stosowano egzogenne NO nitroglicerynę. Natomiast użycie wyłącznie blokera znacząco redukowało całkowity przepływ krwi przez trzustkę [109,110]. Spadek trzustkowego krążenia był większy w warunkach pobudzenia sekrecyjnego niż w warunkach spoczynkowych co sugeruje, że NO związany jest głównie z przekrwieniem czynnościowym wynikającym z lokalnego metabolicznego zapotrzebowania.

W związku z tym, że inhibitor syntazy NO nie posiada własnych specyficznych naczynio-kurczących zdolności [111]

zmniejszenie wielkości krążenia trzustkowego wynika raczej z zahamowania biosyntezy endogennego czynnika rozszerzającego naczynia. Jest to zgodne z obserwacją, że L-arginina uważana za substrat konieczny do syntezy tlenku azotu w komórkach śródbłonna zapobiega całkowicie hamującemu efektowi działania L-NNA na krążenia trzustkowe.

Podobnie jak kontrola egzokrynnej czynności trzustki nie do końca pozostaje wyjaśniona patogeneza ostrego zapalenia trzustki. Mechanizm powstawania zmian patologicznych związany jest z załamaniem się naturalnych barier zapobiegających śródtrzustkowej aktywacji enzymów trawiennych. W warunkach doświadczalnych obraz zmian histologicznych zależy od modelu wywoływania stanu zapalnego. W przypadku hiperstymulacji wysokimi dawkami ceruleiny ($10 \mu\text{g/kg/h}$) można obserwować rozwój śródmiąższowego obrzęku z odczynem zapalnym oraz postępującą wakuolizacją komórek pęcherzykowych. Z reguły zapalenie trzustki wywoływane ceruleiną nie prowadzi do śmierci zwierząt, a po upływie 2-3 dni obserwowane są postępujące procesy regeneracyjne [2,40,41].

Wykorzystując model hiperstymulacji hormonalnej przeprowadziłam badania mające na celu stwierdzenie czy synteza NO posiada wpływ na przebieg procesu chorobowego. Pięciogodzinna infuzja ceruleiny w dawce $10 \mu\text{g/kg/h}$ powodowała wzrost masy trzustki i zawartości w niej białka. Ponadto wystąpiły zmiany histologiczne oceniane na podstawie stopnia obrzęku, infiltracji neutrofilów i liczby komórek, które uległy wakuolizacji. Podanie

inhibitora syntazy NO, L-NNA w dawce 20 mg/kg i.v. na początku infuzji ceruleiny spowodowało dalszy wzrost masy trzustki i zawartości protein, jak również nasilenie zmian histologicznych. Wskazuje to na pogłębienie uszkodzeń po zahamowaniu syntazy tlenu azotu. Równoczesne podanie L-argininy w dawce 100 mg/kg w znacznym stopniu zmniejszyło niekorzystny efekt blokera w zakresie wszystkich badanych parametrów, jak również zmniejszyło zmiany powstałe pod wpływem samej hiperstymulacji hormonalnej. Ponadto okazało się, że iniekcja tylko L-NNA (20 mg/kg) powoduje wystąpienie uszkodzeń podobnych, jak przy wysokich dawkach ceruleiny, a więc wzrost masy trzustki, zawartości białka oraz obrzęk i infiltrację leukocytów. Badane parametry znacznie odbiegały od wartości kontrolnych nie osiągając jednak poziomu zmian poceruleinowych (nie występuje wakuolizacja komórek). Wynika z tego, że wysokie dawki L-NNA mogą indukować uszkodzenia naśladujące obrzękowe zapalenie trzustki wywoływane supra-maksymalnymi dawkami ceruleiny. Zmianom tym można zapobiec podając w tym samym czasie co L-NNA L-argininę

Zmiany morfologiczne i histologiczne korelowały ze zmianami przepływu krwi przez trzustkę. Ceruleina spowodowała ponad 50% spadek przepływu, który uległ dalszemu obniżeniu po L-NNA. Przepływ powracał do wartości wyjściowych po L-argininie. Rezultaty badań sugerują, że NO poprzez kontrolę wielkości przepływu krwi przez naczynia trzustkowe ingeruje w przebieg procesu zapalnego rozwijającego się w obrębie narządu. Molero i Malagelada [105]

podając L-NAME otrzymali pogorszenie przebiegu zapalenia trzustki wywołwanego ceruleiną u szczurów, co między innymi wyrażało się wzrostem poziomu amylazy w osoczu z 25.6 U/ml do wartości 46 U/ml. Nitroprusydek sodowy, nitrogliceryna redukowały podwyższony poziom amylazy oraz zmniejszały spadek przepływu krwi wywołwany supresją NO. Z powyższych badań wynika, że synteza NO może być traktowana nie tylko jako kolejne ogniwo kontroli zewnątrzwydzielniczej funkcji trzustki ale także jako proces zmniejszający skutki działania czynników wywołujących zmiany zapalne w obrębie trzustki. Przy czym NO działa poprzez regulację wielkości przepływu krwi przez naczynia trzustkowe.

Wyniki badań przeprowadzonych przez Closa i wsp. [112] sugerują, że zmiany syntezy prostanoidów we wczesnych etapach martwiczo-krwotocznego ostrego zapalenia trzustki wywołwanego doprzewodową infuzją 5% taurocholanu sodowego mogą być przynajmniej w części wynikiem wzrostu produkcji NO. Zwiększona synteza eikozanoidów obok zwiększonej ilości wolnych rodników tlenowych traktowana jest jako prawdopodobna przyczyna pogłębiania początkowych uszkodzeń indukowanych solami żółciowymi. Podanie blokera syntazy NO L-NAME przed infuzją taurocholanu sodowego zmniejszało poziom 6-keto-PGF₁ (metabolitu prostacyklin) oraz TXB₂ (metabolitu tromboksanu A₂) w tkance trzustkowej. Close twierdzi, że wynika to z faktu obecności syntazy konstytutywnej NO w komórkach śródbłoka naczyniowego i płytkach gdzie odbywa się także produkcja prostanoidów. Wskutek tego wydaje się, że generowanie

eikozanoidów śródbłonkowych i płytkowych zachodzi za pośrednictwem mechanizmu zależnego od NO. Jednakże możliwe jest także, że za wzrost syntezy prostanoidów w ostrym zapaleniu trzustki odpowiedzialne są inne mechanizmy np. zwiększenie śródkomórkowego poziomu jonów wapnia czy powstawanie wolnych rodników tlenowych. Ponadto Matheis i wsp. [113,114] zaobserwowali, stosując L-NAME w prewencji uszkodzeń sercowych, że supresja syntazy NO może prowadzić do rozwoju wybroczyn w obrębie trzustki a nawet martwiczo-krwotocznego zapalenia trzustki co koreluje z wynikami moich badań. Z kolei Foitzik i wsp. [115] twierdzi, że niedokrwienie trzustki jest w stanie doprowadzić do całkowitej destrukcji komórek trzustkowych działając niezależnie od śródkomórkowej aktywacji proteaz.

Jedną z przyczyn spadku przepływu krwi w czasie zapalenia trzustki wywoływanego ceruleiną, jak wykazałam, była blokada syntezy NO. Prowadziło to prawdopodobnie do niedokrwienia tkanek, konsekwencją czego był spadek sekrecyjnej aktywności komórek pęcherzykowych i spadek liczby komórek o prawidłowej strukturze i funkcjach.

Powyższe wyniki wskazują, że obok w miarę dobrze udokumentowanych poprzednio nerwowych i hormonalnych mechanizmów regulujących zewnątrzwydzielniczą aktywność trzustki prawdopodobnie także tlenek azotu może być uważany za kolejny czynnik związany z tą regulacją. Wyniki moich badań dowodzą, że głównym mechanizmem za pośrednictwem którego NO realizuje się w kontroli funkcji trzustki

jest przepływ krwi przez naczynia trzustkowe. Podobnie w patogenezie ostrego zapalenia trzustki zmiany w obrębie krążenia trzustkowego zależne od NO modyfikują rozwój zmian patologicznych.

W N I O S K I

1. Inhibitor syntazy tlenu azotu - L-NNA, podany szczurom posiadającym przewlekłe przetoki trzustkowe, spowodował niewielki spadek wyrzutu białka i amylazy w warunkach podstawowych, natomiast znacznie hamował wydzielanie trzustki pobudzane pokarmem, ceruleina czy wyprowadzaniem soku trzustkowego na zewnątrz.
2. Hamujący efekt działania L-NNA uległ prawie całkowitemu odwróceniu we wszystkich wykonanych testach przy równoczesnym podaniu L-argininy.
3. Substrat NO L-arginina nie spowodowała zmian w wydzielaniu trzustkowym w warunkach podstawowych i stymulowanych podczas badań *in vivo*.
4. L-NNA, L-arginina lub kombinacja obu substancji nie wywarły żadnego wpływu na spontaniczne uwalnianie amylazy przez izolowane pęcherzyki trzustkowe, zarówno podczas sekrecji podstawowej jak i stymulowanej.
5. L-NNA powodował redukcję przepływu krwi przez trzustkę przy czym jego działanie uległo odwróceniu przy równoczesnym podaniu L-argininy.

6. Uszkodzenia w obrębie trzustki rozwijające się w wyniku hiperstymulacji ceruleinowej uległy nasileniu pod wpływem L-NNA.
7. L-arginina nie tylko zmniejszyła zmiany poceruleinowe, ale także zredukowała uszkodzenia wywołane infuzją ceruleiny połączonej z podaniem L-NNA.
8. Samo L-NNA stosowane w dużej dawce powodowało rozwój zmian w obrębie trzustki, które naśladowały uszkodzenia wywoływane ceruleiną, przy czym stopień ich nasilenia był mniejszy. L-arginina podana razem z L-NNA zapobiegła jego uszkadzającemu działaniu.
9. Przepływ krwi przez trzustkę zredukowany po pięciogodzinnej infuzji ceruleiny wykazywał dalszą tendencję spadkową gdy dodatkowo zastosowano L-NNA. Podanie L-argininy nie tylko zapobiegło temu efektowi ale także podniosło przepływ poceruleinowy.

S T R E S Z C Z E N I E

Produkcja oraz wydzielanie enzymów trawiennych i elektrolitów będących podstawowymi składnikami soku trzustkowego pozostaje pod kontrolą wielu różnych mechanizmów neurohormonalnych. Aktywność nerwów błędnych jest jednym z wiodących czynników decydujących o wielkości sekrecji trzustkowej. W zależności od rodzaju działających bodźców, stymulacja nerwów błędnych może być pochodzenia ośrodkowego, co ma miejsce w fazie głowowej sekrecji trzustkowej lub może być wynikiem odruchów wago-wagalnych w fazie żołądkowej i jelitowej. Produkty degradacji pokarmów powodują uwalnianie hormonów jelitowych będących obok czynników nerwowych niezwykle istotnymi regulatorami zewnątrzwydzielniczej aktywności trzustki. Produkcja oraz wydzielanie enzymów związane są przede wszystkim z cholecystokininą, natomiast sekretyna stymuluje głównie sekrecję elektrolitów. Pomędzy czynnikami nerwowymi i hormonalnymi istnieje ścisła interakcja umożliwiająca prawidłowe funkcjonowanie elementów wydzielniczych trzustki.

Sok trzustkowy zawiera bogaty zestaw enzymów trawiących zarówno tłuszcze jak i białka oraz węglowodany. Spośród nich proteazy spełniają także funkcje regulacyjne w stosunku do wydzielania trzustkowego, przy czym w mechanizmie tego zjawiska wydają się uczestniczyć substancje hormonalne.

W związku z tym, że enzymy trzustkowe cechują się dużą aktywnością trawienną istnieje szereg barier zabezpieczających narząd przed autodestrukcją. Jedną z nich stanowi zjawisko oddzielnego syntezywania, magazynowania oraz wydzielania enzymów w postaci nieaktywnych prekursorów, które przechodzą w formy czynne dopiero w świetle jelit. Prekursory magazynowane jako ziarnistości zymogenne rozdzielone są wewnątrz komórek przez błony lipoproteinowe. Sok trzustkowy jak i sama trzustka zawierają inhibitor polipeptydowy tworzący z trypsyną nieczynny kompleks co zapobiega wewnątrznarządowej aktywacji enzymów trawiennych. Naruszenie którejkolwiek z barier ochronnych lub niedobór inhibitora prowadzi do uruchomienia śródtrzustkowej kaskady uaktywniania enzymów proteolitycznych i następczego rozwoju zmian patologicznych.

Wykazano, że rozwój procesu chorobowego ściśle koreluje z wielkością przepływu krwi przez trzustkę. Poza tym przepływ krwi jest istotnym czynnikiem regulującym aktywność sekrecyjną trzustki w warunkach fizjologicznych.

Celem mojej pracy było wykazanie jaką rolę odgrywa tlenek azotu (NO), produkowany między innymi przez komórki śródbłonna naczyniowego, w regulacji sekrecji i przepływu krwi przez trzustkę oraz w rozwoju zmian zapalnych. Stosując bloker syntazy NO stwierdzono u zwierząt z chronicznymi przetokami trzustkowymi znaczny spadek w wydzielaniu białka i amylazy przez komórki pęcherzykowe trzustki. Szczególnie silnie było to wyrażone podczas

wydzielania stymulowanego pokarmem, ceruleina czy odprowadzaniem soku trzustkowego na zewnątrz. Hamujące działanie L-NNA ulegało częściowemu lub całkowitemu odwróceniu przy równoczesnym podaniu L-argininy substratu dla NOS. Sama L-arginina nie wpływała w istotny sposób na wielkość stymulowanej i podstawowej sekrecji trzustkowej. W przeciwieństwie do zmian w wydzielaniu trzustkowym *in vivo* podając L-NNA, L-argininę lub obie substancje razem do środowiska inkubacyjnego izolowanych pęcherzyków trzustkowych nie zaobserwowano istotnych zmian w uwalnianiu amylazy w warunkach podstawowych i stymulowanych.

Kolejnym etapem badań było określenie udziału NO w patogenezie ostrego zapalenia trzustki. Eksperymenty przeprowadzono z użyciem modelu wywoływania zapalenia trzustki wysokimi dawkami ceruleiny. Podawanie L-NNA na początku infuzji ceruleiny znacznie pogłębiło uszkodzenia tkanki trzustkowej. Zwiększył się ciężar trzustki oraz zawartość w niej białka, a w badaniu histologicznym zaobserwowano znacznie rozleglejszy obrzęk, naciek zapalny, większa liczba komórek uległa wakuolizacji w porównaniu z grupą, która otrzymała tylko infuzję ceruleiny. L-arginina zastosowana na początku eksperymentu nie tylko zmniejszyła nasilenie zmian poceruleinowych ale także uszkodzeń rozwijających się po ceruleinie i L-NNA. Zaobserwowano również, że L-NNA podany w wysokiej dawce prowadzi sam do rozwoju zmian patologicznych podobnie jak po hiperstymulacji hormonalnej przy czym ich rozległość jest znacznie mniejsza. Jednoczesne podanie L-argininy jest w stanie zapobiec

temu procesowi.

W badaniach nad przepływem krwi przez trzustkę stwierdzono, że następuje jego spadek po L-NNA w warunkach wydzielania podstawowego i stymulowanego oraz, że można temu zapobiec podając L-argininę. Ponadto okazało się, że patologiczna dawka ceruleiny redukuje przepływ krwi przez trzustkę. Spadek wielkości przepływu jest większy gdy zostanie dodatkowo podany L-NNA. L-arginina zapobiega powyższemu efektowi.

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że w warunkach fizjologicznych NO wpływa na sekrecję trzustkową na drodze pośredniej prawdopodobnie poprzez zmiany przepływu krwi przez trzustkę. Dowodem na to jest fakt, że przy redukcji przepływu następuje równolegle spadek wielkości wydzielania trzustkowego ale tylko podczas badań *in vivo*.

Podobnie NO wpływa na przebieg procesu zapalnego rozwijającego się w trzustce za pośrednictwem zmian w krążeniu trzustkowym. Zahamowanie syntezy NO-czynnika rozkurczającego mięśnie gładkie naczyń prowadzi do pogłębienia procesu chorobowego. Wynika z tego, że tlenek azotu zaliczany do nowej klasy mediatorów biologicznych działając poprzez regulację przepływu krwi może być traktowany jako czynnik wpływający na zewnątrzwydzielniczą aktywność trzustki, jak również jako czynnik związany z patogenezą ostrego zapalenia trzustki.

B I B L I O G R A F I A

1. DiMagno E.P. A short eclectic history of exocrine pancreatic insufficiency and chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1993; 104; 1255-1262.
2. Go V.L.W., Gardner J.D., Brooks F.P., Lebenthal E., DiMagno E., Scheele G.A. The exocrine pancreas. Biology, pathobiology, and diseases. Raven Press 1986
3. Grossman M.J. Neural and hormonal stimulation of gastric secretion of acid. *Handbook of Physiology, Alimentary Canal* vol II edited by C.F.Code. p. 835-863
4. Itoh Z., Hondo R., Hiwatashi R. Biphasic secretory response of exocrine pancreas to feeding. *Am. J. Physiology* 1980; 238; G332-337
5. Chen M.H., Joffe S.N., Mages D.F., Murphy R.F., Naruse S. Cyclic changes of plasma pancreatic polypeptide and pancreatic secretion in dogs. *J. Physiol. (London)* 1983; 341; 453-461
6. Niebel W., Singer M.V., Hanssen L.E., Goebell H. Effect of atropine on pancreatic bicarbonate output and plasma concentrations of immunoreactive secretion to intraduodenal stimulants. *Scand. J. Gastroenterol.* 1983; 18; 803-808
7. Holst J.J., Fahrenhrug J., Knuthsen S., Jensen S.L., Nielsen O.V., Lundberg J.M., Hokfelt T. VIP and PH1 in the pig pancreas: coexistence, corelease, and cooperative effects

- Am. J. Physiol. 1987; 252 (Gastrointest. Liver Physiol. 15); G
182-189
8. Knuthsen S., Holst J.J., Jensen S.L., Knigge U., Nielsen O.V.,
Gastrin Releasing Peptide: Effect on exocrine secretion, and
release from isolated perfused porcine pancreas.
Am. J. Physiol. 1985; 248 (Gastrointest. Liver Physiol. 3); G
281-286
 9. Larson L.I. Innervation of the pancreas by Substance P,
enkephalins, Vasoactive Intestinal Polypeptide and Gastrin
(CCK immunoreactive nerves. J. Histochem. Cytochem. 1979; 27;
1283-1284
 10. Reineche M. Neurotensin. Immunohistochemical localization in
central and peripheral nervous system and in endocrine cells
and its functional role as neurotransmitter and endocrine
hormone (review). Progress in Histochemistry and Cytochemistry
1985; 16(1); 1-172
 11. Lundberg J.M., Terenius L., Hokfeldt T., Goldstein M. High
levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons
in various mammals including man. Neurosci. Lett. 1983; 42;
167-172
 12. Seifert H., Sawchenko P., Chestnut J., Rivier J., Vale W.,
Pandolf S.J. Receptor for Calcitonin Gene-Related Peptide:
binding to exocrine pancreas mediates biological action.
Am. J. Physiol. 1985; 249 (Gastrointest. Liver Physiol. 12) G
147-151

13. Dunning B.E., Ahren, Veith R.C., Bottcher G., Sundler F., Taborsky G.J. Galanin: a novel pancreatic neuropeptide. *Am. J. Physiol.* 1986, 251 (Endocrinol. Metab. 14): E 127-133
14. Chey W.Y. Regulation of pancreatic exocrine secretion. *Int. J. Pancreatology* 1991; 9; 7-17
15. Blair E.L., Brown J.C., Harper A.A., Scratcherd T. A gastric phase of pancreatic secretion. *J. Physiol. (London)* 1966; 184; 812-824
16. White T.T., Magee D.F. Evidence for the existence of gastro-pancreatic reflex. *Am. J. Physiol.* 1960; 198; 725-728
17. White T.T., McAlexander R.A., Magee D.F. The effect of gastric distension on duodenal aspirates in man. *Gastroenterology* 1963; 44; 48
18. Debas H.T., Yamagishi T. Evidence for pyloropancreatic reflex for pancreatic exocrine secretion. *Am. J. Physiol.* 1978; 234; E468-471
19. Vagne M., Grossman M.J. Gastric and pancreatic secretion in response to gastric distension in dogs. *Gastroenterology* 1969; 57; 300-310
20. Singer M.V. Latency of pancreatic fluid secretory response to intestinal stimulants in the dogs. *J. Physiol. (London)* 1983; 339; 75-85
21. Singer M.V., Solomon T.E., Wood J., Grossman M.J. Latency of pancreatic enzyme response to intraduodenal stimulants. *Am. J. Physiol.* 1980; 238; G23-29

22. Singer M.V., Solomon T.E., Grossman M.J. Effect of atropine on secretion from the intact and transplanted pancreas in the dogs. *Am. J. Physiol.* 1980; 238; G18-22
23. Meyer J.H. Control of pancreatic exocrine secretion. *Physiology of the Gastrointestinal Tract* edited by L.R. Johnson, Raven Press 1981, 821-829
24. Solomon T.E., Grossman M. Effect of atropine and vagotomy on response of transplanted pancreas. *Am. J. Physiol.* 1979; 236; 186-190
25. Meyer J.H., Kelly G.A. Canine pancreatic responses to intestinally perfused proteins and protein digest. *Am. J. Physiol.* 1976; 231; 682-691
26. Meyer J.H., Kelly G.A., Jones R.S. Canine pancreatic response to intestinally perfused oligopeptides. *Am. J. Physiol.* 1976, 231; 678-681
27. Konturek S.J., Radecki T., Thor P., Dembiński A. Release of cholecystokinin by amino acids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1973; 143; 305-309
28. Dzieniszewski J., Gabryelewicz A. *Choroby trzustki PZWL* 1991
29. Chey W.Y., Kim M.S., Lee K.Y. Influence of the vagus nerve on the release and action of secretion in dog. *J. Physiol.* (London) 1979; 293; 435-446
30. You C.H., Rominger J.M., Chey W.Y. Effects of atropine on the action and release of secretion in humans *Am. J. Physiol.* 1982; 242; 608-611

31. You C.H., Chey W.Y. Atropine abolishes potentiation effect of secretin and cholecystokinin octapeptide on exocrine pancreatic secretion in humans. *Pancreas* 1988; 3 (1); 99-103
32. Green G.M., Lyman R.L. Feedback regulation of pancreatic enzyme mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1972; 140; 6-12
33. Go V.L.W., Gardner J.D., Brooks E.P., Lebenthal E., DiMagno E., Scheele G.A. *The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease*. Raven Press, Second Edition 1993
34. Imamura M., Lee K.Y., Song Y., Moriyam M., Chang T.M., Chey W.Y. Role of secretin in negative feedback regulation in dogs. *Gastroenterology* 1993; 105; 548-553
35. Louie D.S., May D., Miller P., Owyang C. Cholecystokinin mediates feedback regulation of pancreatic enzyme secretion in rats. *Am. J. Physiol.* 1986; 250; G252-250
36. Shiratori K., Chen Y.F, Chey W.Y., Lee K.Y., Chang T.M. Mechanism of increased exocrine pancreatic secretion in pancreatic juice-diverted rats *Gastroenterology* 1986; 91; 1171-1178
37. Folsch U.R., Canton P., Wilms H.M., Schafmayer A., Becher H.D., Creutzfeldt W. Role of cholecystokinin in the negative feedback control of pancreatic enzyme secretion in conscious rats. *Gastroenterology* 1987; 92; 449-458
38. Kogine M., Inone K., Hosotani R., Huang Y.S., Thompson J.C.,

- Tobe T. Pancreatic secretion and the release of cholecystokinin after a meal in dogs with and without exclusion of pancreatic juice. *Scand. J. Gastroenterology* 1989; 24; 507-512
39. Shiratori K., Jo Y.H., Lee K.Y., Chang T.M., Chey W.Y. Effect of pancreatic juice and trypsin on oleic acid stimulated pancreatic secretion and plasma secretin in dogs. *Gastroenterology* 1989; 96; 1330-1335
40. Lampel M., Kern H. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of pancreatic secretagogue. *Virchows Arch. A. histol.* 1977; 373; 97-117
41. Watanabe O, i in. Effects of supramaximal caerulein stimulation on the ultrastructure of rat pancreatic cell; early morphological changes during the development of experimental pancreatitis. *Am. J. Physiol.* 1984; 246; G457-467
42. Adler G., Rohr G., Kern H.F. Alteration of membrane fusion as a cause of acute pancreatitis in the rat. *Dig. Dis. Sci.* 1982; 27; 983-1001
43. Wood J., Garcia R., Solomon T.E. A simple model for acute pancreatitis: high dose caerulein injection in rat. *Gastroenterology* 1982; 82; 112-118
44. Niederau C., Luthen R., Niederau M.C., Grendall J.H., Ferrell L.D. Acute experimental hemorrhagic-necrotizing pancreatitis induced by feeding a choline-deficient, ethionine supplemented

diet. 1992 S. Karger AG Basel

45. Lombardi B., Estes L.W., Longneckzer D.S. Acute haemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionine fed with choline deficient diet. Am. J. Pathol. 1992; 79; 465-480
46. Koike H., Sterr M.L., Meldolesi J. Pancreatic effect of ethionine. Blockade and appearance of crinophagy and autophagy precede cellular necrosis. Am. J. Physiol. 1982; 242; G297-307
47. Rueda J.C., Ortega L., Arguello J.M., Torres A.J., Londa I., Balibrea J.L. Acute experimental pancreatitis in rat induced by sodium taurocholic acid: objective quantification of pancreatic necrosis. Virchows Arch. 1992; 117-120
48. Yamagushi Y., Matsumo K., Gato M., Ogara M. In situ kinetics of acinar, duct, and inflammatory cells in duct ligation induced pancreatitis in rats. Gastroenterology 1993; 104; 1498-1506
49. Waldner H. Vascular mechanisms to induce Acute Pancreatitis. European Surg. Research 1992; 24; 62-67
50. Nahamo S., Watanabe N., Kihara Y., Otsuki M. New model acute pancreatitis induced by excessive doses of lysine in rats. Int. J. Pancreatol. 1992;
51. Konturek S.J. Fizjologia układu trawiennego. PZWL 1985
52. Prinz R.A. Mechanisms of acute pancreatitis (vascular etiology). Int. J. Pancreatology 1991; 9; 31-33

53. Adler D., Hupp T., Kern H.F. Course and spontaneous regression of acute pancreatitis in rats. *Virchows Arch* 1979; 31; 282-294
54. Robert A., Blum J.T., Lancaster C., Olafsson A.S., Kolbasa K.P., Nezamis J.E. Prevention by prostaglandins of caerulein-induced pancreatitis in rats . *Lab. Invest.* 1989; 60; 677-691
55. Pfeffer R.B., Lozzarim-Robertson A., Sdafi D., Mixter G.J., Secoy C.F., Hinton J.W. Gradation of pancreatic, edematous through hemorrhagic experimentally produced by controlled injection of microspheres into the blood vessels in dogs. *Surgery* 1962; 51; 764-769
56. Broc P.J., Znidema G.D., Cammeron J.L. The role of ischemia in acute pancreatitis: studies with an isolated perfused canine pancreas. *Surgery* 1981; 91; 377-383
57. Popper H.L., Nechela H., Russell K.C. Transition of pancreatic edema to pancreatic necrosis. , *Surg. Gynecol. Obstet.* 1978; 87; 79-82
58. Warshaw A.L., OHara P.J. Susceptibility of the pancreas to ischemic injury in shock. *Ann. Surg.* 1978; 188; 197-201
59. Rose D.M., Ranson J.H.C., Cunningham J.N., Spencer F.C. Patterns of severe pancreatitis following cardiopulmonary bypass. *Ann. Surg.* 1984; 199; 168-172
60. Panebianco A.C., Scott S.M., Part C.H., Takarot Echegaray H.M. Acute pancreatitis following extracorporeal. *Am. Ther. Surg.* 1970; 9; 562-568

61. Aunes A, Semb L.S. The effect of secretin and pancreozimin on pancreatic blood flow in the conscious and anesthetized dog. *Acta Physiol. Scand.* 1969; 76; 406-414
62. Lenninger S. Effects of acetylcholine and papaverine on the secretion and blood flow from the pancreas of the cat. *Acta Physiol. Scand.* 1973; 89; 260-268
63. Beijer H.J.M., Brouwer F.A.S., Charbon G.A. Time course and sensitivity of secretin stimulated pancreatic secretion and blood flow in the anesthetized dog. *Scand. J. Gastroenterol.* 1979; 14; 295-300
64. Konturek S.J., Pawlik W., Czarnobilski K., Gustaw P., Jaworek J., Beck G., Jendrella H. Effects of leukotriens C4 on pancreatic secretion and circulation in dogs. *Am. J. Physiol.* 1988; 254; G849-855
65. Inoue K., Hosotani R., Tatemoto K., Yajima H., Tobe T. Effect of natural peptide YY on blood flow and exocrine secretion of pancreas in dogs. *Dig. Dis. Sci.* 1988; 33; 828-832
66. Harper S.L., Pitts V.H., Granger D.N., Kuietys P.R. Pancreatic tissue oxygenation during secretory stimulation. *Am. J. Physiol.* 1986; 250; G316-322
67. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288; 373-376
68. Snyder S.H., Bredt D.S. Biological role of Nitric Oxide. *Scientific American* 1992 May; 68-77

69. Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric Oxide release accounts for the biological activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Nature* 1987; 327; 524-526
70. Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chandhuri G. Endothelium -Derived Relaxing Factor produced and released from artery and vein is Nitric Oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84; 9265-9269
71. Snyder S.H. Nitric Oxide: First in a new class of neurotransmitters? *Science*. 1992; 257
72. Desai K.M., Zembowicz A., Sessa W.C., Vane J.R. Nitroergic nerves mediate vagally induced relaxation in the isolated stomach of the guinea pig. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 27; 1786
73. Stark M.E., Szurszewski J.H. Role of Nitric Oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology* 1992; 103; 1928-1949
74. Whittle B.J.R., Lopez Belmonte J., Moncada S. Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rats. *Br. J. Pharmacol.* 1990; 99; 607-617
75. Konturek S.J., Brzozowski T., Majka J., Szlachcic A., Nauert Ch., Slomiany B. Nitric Oxide in gastroprotection by aluminium-containing antacids. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; 229; 155-162
76. Konturek S.J., Brzozowski T., Majka J., Czarnobilski K. Role

- of Nitric Oxide and prostaglandins in sucralfate induced gastroprotection. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; 211; 277-279
77. Konturek S.J., Brzozowski T., Majka J., Pytko-Polończyk J., Stachura J. Inhibition of nitric oxide synthase delays healing of chronic gastric ulcers. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 239; 215-217
 78. Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2; 1057-1058
 79. Radomski M.W., Palmer R.M.J., Moncada S. Characterization of the L-arginine: nitric oxide pathway in human platelets. *Br. J. Pharmacol.* 1990; 101; 325-328
 80. Schmidt H.H.H., Warner T.D., Ishii K., Sheng H., Murad F. Insulin secretion from pancreatic B cells caused by L-arginine derived nitric oxide. *Science* 1992; 255; 721-723
 81. Vincent S.R., Schmidt H., Warner T.D., Ishii H., Sheng H., Murad F. Nitric oxide and L-arginine, evoked insulin secretion. *Science* 1992; 258; 1376-1378
 82. Ignarro L.J. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J* 1988; 3; 31-36
 83. Rubanyi G.M., Vanhoutte P.M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* 1986; 250; H822-827
 84. Gryglewski R., Palmer R.M.J., Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986; 320; 454-456

85. Martin W., Smith J.A., White D.G. The mechanism by which haemoglobin inhibits the relaxation of rabbit aorta induced by nitrovasodilators, nitric oxide or bovine retractor penis inhibitory factor. *Br. J. Pharmacol.* 1986; 89; 563-571
86. Brosnan J.T., Dhanakoti S.N., Skanes S.M., Wu G., Herzberg G.R., Brosnan M.E. Endogenous arginine synthesis. In: *The Biology of Nitric Oxide*, S. Moncada, M.A. Marletta, J.B. Hibbs Jr., E.A. Higgs (eds), Portland Press Proceedings 1992, pp. 32-34.
87. Forsterman U., Schmidt H., Pollock J.S., Sheng H., Mitchell J.A., Warner T.D., Nakane M., Murad F. Characterization and classification of constitutive and inducible isoforms of nitric oxide synthase in various cell types. In: *The Biology of Nitric Oxide*, S. Moncada, M.A. Marletta, J.B. Hibbs Jr., E.A. Higgs (eds), Portland Press Proceedings 1992, pp. 21-23.
88. Stuehr D.J., Cho H.J., Kwon N.S., Nathan C.F. The cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase is flavoprotein containing flavin adenine dinucleotide and flavin mononucleotide. In: *The Biology of Nitric Oxide*, S. Moncada, M.A. Marletta, J.B. Hibbs Jr., E.A. Higgs (eds), Portland Press Proceedings 1992, pp. 1-3.
89. Mayer B., John M., Heinzl B., Klatt P., Werner E.R., Bohme E. Properties of Ca-regulated brain nitric oxide synthase. In: *The Biology of Nitric Oxide*, S. Moncada, M.A. Marletta, J.B. Hibbs Jr., E.A. Higgs (eds), Portland Press Proceedings 1992.

pp. 4-6.

90. Mulligan M.S., Moncada S., Ward P.A. Protective effects of inhibitors of nitric oxide synthase in immune complex-induced vasculitis. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 107; 1159-1162
91. Gross S.S., Jaffe E.A., Levi R., Kilbourn R.G. Cytokine-activated endothelial cells express an isotype of nitric oxide synthase which is tetrahydrobiopterin-dependent, calmodulin-independent and inhibited by arginine analogs with a rank-order of potency characteristic of activated macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 178
92. Schini V.B., Vanhoutte P.M. Inhibitors of calmodulin impair the constitutive but not the inducible nitric oxide synthase activity in the rat aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; 261;
93. Rogers N.E., Ignarro L.J. Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 189
94. Bogle R.G., Moncada S., Pearson J.D., Mann G.E. Identification of inhibitors of nitric oxide synthase that do not interact with the endothelial cell L-arginine transport. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 105; 91P
95. Ormai S., Sasavari M., Endorozi E. A new technique for chronic pancreatic cannulation in rats. *Scand. J. Gastroenterol.* 1986; 21; 445-512
96. Konturek S.J., Krzyżek E., Bilski J. The importance of gastric secretion in feedback control of interdigestive and

- postprandial pancreatic secretion in rats. *Regulatory Peptides* 1991; 36; 85-97
97. Jaworek J., Konturek P.K., Konturek S.J., Cai R.Z., Schally A.V. Action of novel bombesin receptor antagonists on pancreatic secretion in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; 214; 239-245
98. Konturek S.J., Dembiński A., Konturek P.J., Warzecha Z., Jaworek J., Gustaw P., Tomaszewska R., Stachura J. Role of platelet activating factor in pathogenesis of acute pancreatitis in rats. *Gut* 1992;33; 9; 1268-1274
99. Tomaszewska R., Dembiński A., Warzecha Z., Banaś M., Konturek S.J., Stachura J. Platelet Activating Factor (PAF) inhibitor (TCV-309) reduces caerulein and PAF-induced pancreatitis. A morphologic and functional study in the rats. *J. Pharmacol.* 1992; 43; 4; 345-352
100. Bernfeld P. Amylase alfa and beta. *Methods Enzymol.* 1955; 5; 139-148
101. Amsterdam A., Solomon T.E., Jamieson J.D. Sequential dissection of the pancreas into lobules, acini, and individual cells. *Methods in Cell Biology*, Academic Press N.Y., 1972; 20; 361-378
102. Williams J.A., Korc M., Dormer R.L. Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* 1978; 235; E517-524
103. Peiken S.R., Rottman A.J., Batzri S., Gardner J.D. Kinetics of

- amylase released by dispersed acini prepared from guinea pig pancreas. *Am. J. Physiol.* 1978; 235; E745-749
104. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193; 265-275
 105. Molero X., Guarner F., Malagelada J.R. Nitric oxide blockade inhibits pancreatic secretion in vivo but potentiates caerulein- induced acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1992; 102; A279
 106. Konturek S.J., Bilski J., Konturek P.K., Cieszkowski M., Pawlik W.W. Role of endogenous nitric in the control of canine pancreatic secretion and blood flow. *Gastroenterology* 1993; 104; 896-902
 107. Holst J.J., Rasmussen T.N., Schmidt P. Nitric oxide is important element in neurally induced pancreatic exocrine secretion. XXIV Congress of Europ. Pancreatic Club, Ulm 1992
 108. Beijer H.J.M., Maas A.H.J., Charbon G.A. A vasopressin- induced decrease in pancreatic blood flow and in pancreatic exocrine secretion in the anesthetized dog. *Pfluger Arch.* 1984; 400; 324-328
 109. Pawlik W., Gustaw P., Czarnobilski K., Sendur R., Pawlik T., Konturek S.J. Role of nitric oxide in the regulation of pancreatic blood flow and secretion. XXIV Congress of the Europ. Pancreatic Club, Ulm 1992, A102
 110. Konturek S.J., Bilski J., Pawlik W., Czarnobilski K., Gustaw

- P., Sendur R. Release of nitric oxide upon and meal-induced stimulation of exocrine secretion in dogs. XXIV Congress of Europ. Pancreatic Club, Ulm 1992, A171
111. Rees D.D., Palmer R.M.J., Hodson H.F., Moncada S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation Br. J. Pharmacol. 1988; 96; 418-424
 112. Closa D., Hotter G., Prats N., Bulbena O., Rosello Catafau J., Fernandez-Cruz L., Gelpi E. Prostanoid generation in early stages of acute pancreatitis. Role of Nitric oxide. Gastroenterology (in press)
 113. Bockman D.E. Microvasculature of the pancreas. Int. J. Pancreatol. 1992; 12; 11-21
 114. Matheis G., Sherman M.P., Buckberg G.D., Haybron D.M., Young H.H., Ignarro L.J. Role of L-arginine nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. Am. J. Physiol. 1992; 262; H16-20
 115. Foitzik T., Lewandowski K.B., Fernandez del Castillo C., Rattner D.w., Warshaw A.L. Ischemia aggravates pancreatic injury in acute experimental pancreatitis without increasing protease activation. XXV Congress of Europ. Pancreatic Club. Paris, 1993