

H. HOMAŃSKA-SZAFRANOWA, J. OLEKSY, Z. SZAFRAN

WPŁYW OCZYSZCZONYCH PREPARATÓW SEKRETYNY I PANKREOZYMINY ORAZ PILOKARPINY NA WYDZIELANIE ENZYMÓW W SOKU TRZUSTKOWYM PSA

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie

Kierownik: prof. dr B. Skarżyński

i z Zakładu Fizjologii A. M. w Krakowie

Kierownik: prof. dr J. Kaulbersz

Zastosowanie nowoczesnych metod rozdziału mieszaniny białek pozwoliło na dokładniejszą charakterystykę poszczególnych enzymów, zawartych w soku trzustkowym, a szczególnie na określenie zmian ilościowych wzajemnego stosunku pojedynczych enzymów, zależnie od charakteru bodźca wyzwalającego wydzielanie soku. Wykorzystując metodę elektroforezy opracowaną przez *Tiseliusa* dla rozdziału enzymów soku trzustkowego, badacze amerykańscy już przed kilkoma laty wykazali obecność w tym soku 4—6 frakcji białkowych, wędrujących z różną szybkością w polu elektrycznym, stwierdzając równocześnie, że z pewnymi określonymi frakcjami związany jest określony charakter aktywności enzymatycznej (3, 19). Badania te przeprowadzane były na soku trzustkowym psa, wydzielanym z przetoki trwałej, przy czym jako bodźce służyły różne rodzaje pobieranego przez zwierzę pokarmu. Dawniejsze badania nasze (9) dotyczyły soku trzustkowego psa, uzyskanego z przetoki ostrej przy użyciu HCl wprowadzanego dodwunastniczo, wyciągu z błony śluzowej jelita oraz pilokarpiny jako bodźców sokopędnych. Rozdzielając uzyskany w ten sposób sok trzustkowy przy stosowaniu elektroforezy bibułowej, stwierdziliśmy zgodnie z wyżej wymienionymi autorami amerykańskimi, że białka soku rozdziela się na 6 frakcji, cechujących się niezmiennym wzajemnym stosunkiem procentowym. Stwierdziliśmy zarazem, że trzy główne enzymy soku trzustkowego — amylaza, lipaza oraz enzymy proteolityczne wędrują z odmiennymi frakcjami białkowymi. Zawartość poszczególnych enzymów zmienia się zależnie od zastosowanego bodźca, ale w sposób różny.

Przeprowadzone przez nas badania miały charakter raczej ogólnie orientacyjny. Pomijając już to, że ograniczały się tylko do kilku enzymów, obarczone były pewnym źródłem błędu, jakim było zastosowanie w charakterze bodźca humoralnego wyciągu z błony śluzowej jelita, który przecież oprócz sekretyny i pankreozyminy zawierał niewątpliwie pożądaną ilość białek nieswoistych o nieznanym lub też nie dającym się bliżej określić sposobie działania na komórki gruczołu trzustkowego.

Jak wiadomo czynność wydzielnicza trzustki jest regulowana przez bodźce nerwowe, których odpowiednikiem w warunkach doświadczal-

nych jest działanie pilokarpiny lub acetylocholino i przez bodźce humoralne, reprezentowane przez wytworzoną w błonie śluzowej dwunastnicy sekretynę i pankreozyminę-cholecystokininę. Badania *Harpera* i *Rapera* (7) oraz *Jorpesa* i wsp. (12, 13, 14) doprowadziły do uzyskania tych hormonów w stanie czystym. Najczystsze otrzymane dotychczas preparaty pankreozyminy oprócz pobudzania czynności wydzielniczych trzustki powodują równocześnie opróżnianie się woreczka żółciowego, okazują więc również działanie przypisywane cholecystokininie. Najprawdopodobniej więc pankreozymina jest identyczna z cholecystokininą.

Dotychczasowe badania, polegające na zastosowaniu oczyszczonych preparatów obu hormonów śluzówki dwunastnicy wykazują, że charakter działania tych dwóch substancji jest różny (2, 7, 12, 13, 14, 16, 22). Sekretyna według większości badaczy powoduje wzrost objętości soku i stężenia dwuwęglanów, natomiast pankreozymina pobudza wydzielanie enzymów bez zwiększenia objętości wydzielonego soku. Działanie sekretyny można by według *Babkina* określić, jako hydrelatyczne („wassertreibend” według *Heidenhaina*), pankreozyminy — jako ekboliczne (troficzne według *Heidenhaina*).

Dotychczasowe badania nad wpływem sekretyny i pankreozyminy oraz bodźców parasympatykomimetycznych na wydzielanie enzymów soku trzustkowego nie dają pełnego obrazu zagadnienia. *Wang*, *Grossmann* i *Ivy* (22) wykazali, że podawanie pankreozyminy pobudza wydzielanie amylazy, nie ma natomiast wpływu na wydzielanie zasadowej fosfatazy. Przyjmują oni jednak równoległość wydzielania trzech głównych enzymów soku — amylazy, lipazy i proteaz. Według *McCance* i wsp. (18) aktywność esterazy cholinowej w soku wydzielanym po podaniu pilokarpiny jest około 5 razy większa, niż po podaniu preparatów sekretyny. *Komarow* i wsp. (15) kwestionują postulat stałości proporcji trzech głównych enzymów soku trzustkowego i ich stosunek do ilości białka w soku. *Lin* i *Grossman* (16) stwierdzili zależność ilości wydzielanej amylazy od dawki pankreozyminy i metacholino nakładanej na stałe pobudzanie sekretyną.

Dotychczasowe doświadczenia nie dają jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy bez względu na rodzaj zastosowanego bodźca wzajemny stosunek ilości zawartych w soku trzustkowym enzymów pozostaje niezmienny, czy też poszczególne bodźce wpływają w odmienny sposób na wydzielanie pojedynczych enzymów. Korzystając z udzielonych do naszej dyspozycji najczystszych preparatów sekretyny i pankreozyminy, otrzymanych w pracowni prof. *Jorpesa* w Sztokholmie, postanowiliśmy powtórzyć w zmodyfikowanej postaci nasze dawniejsze doświadczenia, posługując się czystą sekretyną i pankreozyminą, zamiast wyciągu z błony śluzowej dwunastnicy oraz rozszerzając zakres badanych enzymów. Badaliśmy zawartość amylazy, lipazy, enzymów proteolitycznych, aliesterazy, esterazy cholinowej oraz zasadowej fosfatazy. Oznaczaliśmy aktywność enzymów i stosunek tej aktywności do ilości zawartego w soku białka.

METODYKA

Doświadczenia przeprowadzano na psach wagi 12—17,5 kg, głodzonych przez 24 godz. przed doświadczeniem. Stosując narkozę morfinowo-eterową, po wyko-

wspólnego, zakładano zewnątrz-jelitowo kaniulę szklaną do głównego przewodu trzustkowego. Po upływie godziny wstrzykiwano jednorazowo dożylnie preparat sekretyny w ilości 300—900 jednostek kocich, rozpuszczony w fizjologicznym roztworze NaCl. Po zakończeniu wydzielania spowodowanego sekretyną podawano w fizjologicznym roztworze soli dożylnie jednorazowo 3 mg pankreozyminy. Chlorowodorek pilokarpiny rozpuszczony w fizjologicznym roztworze soli podawano w ilości 5—15 mg domięśniowo w ciągu kilku minut po zakończeniu wydzielania pod wpływem pankreozyminy. Całość wydzielonego soku zbierano w porcjach o objętości ok. 2 ml w różnych odstępach czasu, w zależności od fazy wydzielania. Od momentu pobierania do wykonania oznaczeń sok przechowywano w temperaturze około 0°. We wszystkich porcjach soku po odpowiednim rozcieńczeniu oznaczano zawartość białka i aktywność poszczególnych enzymów.

Oznaczenia białka wykonywano zmodyfikowaną metodą polegającą na użyciu odczynnika fenolowego Folina-Ciocalteau (5). 1,5 ml rozcieńzonego soku ogrzewano z 1 ml 2,5 n NaOH przez 10 min. na wrzącej łaźni wodnej i następnie do 1 ml oziębionej mieszaniny dodawano 1 ml 0,1 n NaOH, 3 ml wody i 1 ml odczynnika fenolowego Folina-Ciocalteau. Po 15 minutach oznaczano absorpcję światła przez roztwór przy długości fali 600 m μ za pomocą fotokolorymetru Coleman — Junior. Ilość białka obliczano z krzywej wzorcowej tyrozyny, przyjmując, że 1 g tyrozyny daje barwę równoważną 11,5 g białka.

Aktywność amylazy oznaczano według metody Fistera (4). Za jednostkę aktywności enzymu przyjęto według metody tę ilość enzymu, która w czasie 30 minut rozłoży 1 ml 1% roztworu skrobi do stadium achrodekstryn.

Aktywność lipazy oznaczano metodą Pereza i Willemorta (21) z użyciem trójbutyryny jako substratu. Jednostkę aktywności obliczano jak poprzednio (9).

Aktywność proteolityczną soku oznaczano metodą hemoglobinową Ansona (1) i określano w jednostkach hemoglobinowych (20). Nie aktywowano soku enterokinazą, opierając się na samoistnej aktywacji autokatalitycznej lub pod wpływem jonów obecnych w soku.

Oznaczenia aliesterazy wykonywano metodą Hugginsa — Lapidesa (10), stosując jako substrat octan p-nitrofenolu i obliczając jednostkę według autorów metody.

Aktywność esterazy cholinowej oznaczano inkubując 0,30 ml rozcieńzonego soku z 0,20 ml buforu fosforanowego m/15 o pH = 7 i 0,50 ml roztworu chlorku acetylocholinyl przez 10 minut w temperaturze 37°C. Końcowe stężenie substratu wynosiło $3,5 \times 10^{-3}$ m. Nierozłożony przez działanie enzymu chlorek acetylocholinyl oznaczano metodą hydroksamową Hestrina (8). Za jednostkę aktywności enzymu, przyjęto tę ilość enzymu, która w ciągu 1 godziny w warunkach oznaczenia rozkłada z szybkością początkową 1 mg chlorku acetylocholinyl.

Zasadową fosfatazę oznaczano metodą Hugginsa — Talalaya (11) zmodyfikowaną przez Linhardta i Waltera (17) z użyciem fosforanu fenoltaleiny jako substratu. Jednostka aktywności została określona przez autorów metody.

Przy każdej metodzie analitycznej ustalano zależność szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia enzymu.

WYNIKI

Wykonano doświadczenia na 7 psach, którym podawano różne dawki sekretyny, najczęściej w ilości 900 jednostek kocich. Czterem z nich podawano stałą dawkę preparatu pankreozyminy-cholecystokininy w ilości 3 mg. Ostatniemu psu podano równocześnie sekretynę (900 j. k.) z pankreozyminą (3 mg). U wszystkich psów wywoływano w ostatnim stadium doświadczenia wydzielanie przez wstrzyknięcie chlorowodoru

pilokarpiny. Sok zbierano u poszczególnych psów w porcjach po ok. 2—4 ml, mierząc czas wydzielania każdej porcji.

Stwierdzono, że najmniejszą dawką czynną używanego preparatu sekretyny jest 300 jednostek kocich, co przy uwzględnieniu wagi psa daje ok. 20 jednostek na 1 kg wagi ciała. Uzyskane wyniki wykazują, że przebieg procesu wydzielania soku, to znaczy objętość i czas wydzielania poszczególnych porcji po zastosowaniu różnych dawek sekretyny, jest we wszystkich doświadczeniach zasadniczo jednakowy, a wielkość dawki ma wpływ na ogólną objętość wydzielania i czas upływający od rozpoczęcia do zakończenia procesu wydzielania. Wstrzyknięcie 900 jednostek wywoływało wydzielenie średnio 10,5 ml soku. Zastosowanie dawki mniej-

Tabela I.

Objętość i czas wydzielania poszczególnych porcji soku trzustkowego po podaniu sekretyny, pankreozyminy i pilokarpiny.

Rodzaj bodźca	Nr psa	Dawka bodźca	Objętość porcji w ml						Czas wydzielania w min					
			1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Sekretyna	4	500 j. k.	2,0	2,0	3,5	—	—	—	9	4	5	—	—	—
	4	400 j. k.	2,0	2,5	—	—	—	—	10	13	—	—	—	—
	4	300 j. k.	2,5	—	—	—	—	—	12	—	—	—	—	—
	4	500 j. k.	2,0	2,0	2,0	2,0	—	—	7	4	3	11	—	—
	5	600 j. k.	2,0	2,0	—	—	—	—	5	15	—	—	—	—
	5	600 j. k.	2,0	2,0	—	—	—	—	11	9	—	—	—	—
	6	900 j. k.	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	—	9	5	6	6	29	—
	7	900 j. k.	2,5	2,0	2,0	4,0	—	—	9	3	5	15	—	—
	8	900 j. k.	2,0	2,5	2,0	2,0	—	—	9	4	3	13	—	—
	9	900 j. k.	3,5	2,0	2,0	2,0	—	—	7	4	4	12	—	—
9	900 j. k.	2,0	2,0	3,0	2,0	2,0	—	4	4	7	5	5	—	
10	900 j. k.	3,0	2,0	2,0	2,0	3,5	—	6	4	2	7	7	—	
Pankreozymina	6	3 mg	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	5	4	4	4	7	53
	7	3 mg	3,0	3,0	3,0	3,0	—	—	6	3	10	21	—	—
	8	3 mg	3,0	2,0	2,5	1,0	—	—	5	6	5	10	—	—
	9	3 mg	3,0	2,0	3,0	—	—	—	7	5	8	—	—	—
Sekretyna + pankreozymina	10	900 j. k. + 3 mg	2,0	2,0	3,0	—	—	—	16	9	13	—	—	—
Chlorowodorek pilokarpiny	4	15 mg	17,0	—	—	—	—	—	117	—	—	—	—	—
	5	10 mg	4,0	—	—	—	—	—	120	—	—	—	—	—
	6	15 mg	3,0	—	—	—	—	—	94	—	—	—	—	—
	7	10 mg	10,0	3,0	10,0	5,0	—	—	55	14	68	20	—	—
	8	10 mg	1,5	—	—	—	—	—	83	—	—	—	—	—
	9	10 mg	1,0	—	—	—	—	—	68	—	—	—	—	—
10	10 mg	3,0	—	—	—	—	—	69	—	—	—	—	—	

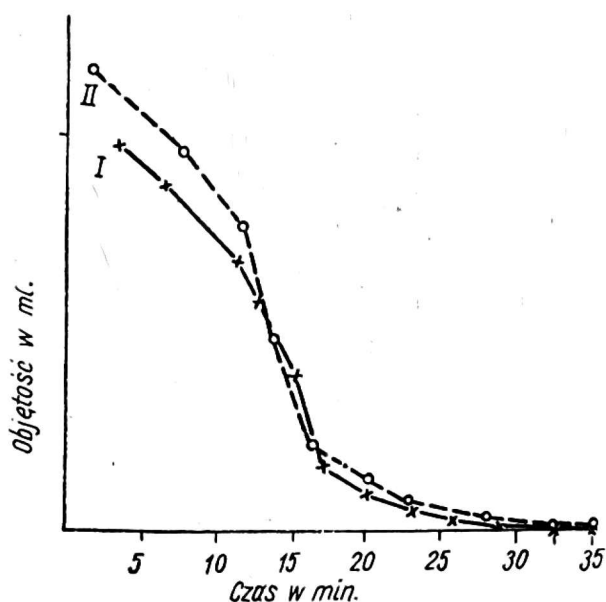
Uwaga: w niektórych doświadczeniach ze względów technicznych do oznaczeń enzymatycznych łączono środkowe porcje.

szej powodowało wydzielenie mniejszej ilości soku oraz skrócenie czasu trwania procesu wydzielniczego, co najwyraźniej widać u psa nr 4, u którego zastosowano najniższą czynną ilość preparatu 300 j. k. Podawanie jednakowych dawek u tych samych lub różnych psów wywoływało efekty bardzo podobne, niezależnie od wagi psa. Bez względu na wielkość dawki, między wstrzyknięciem preparatu a początkiem wydzielania, upływało średnio 55 sek. (48—84 sek.). Czas trwania wydzielania po zastosowaniu 900 j. k. wynosił średnio 32 min., dawki niższe powodowały wydzielanie krótsze, nie przekraczające jednak 12 minut.

Podanie pankreozyminy wywoływało wydzielanie przeciętnie po upływie 50 sek. (48—54 sek.). Objętość soku uzyskanego po jednakowej dawce wahała się u różnych psów bardziej niż po zastosowaniu sekretyny, wynosząc średnio, niezależnie od wagi zwierzęcia, ok. 10 ml. Również czas wydzielania wykazywał większe wahania (średnio 39 min. przy wahaniami od 20 do 77 min.).

Równoczesne podanie preparatu sekretyny i pankreozyminy — cholecystokininy w jednym doświadczeniu spowodowało obniżenie objętości wydzielonego soku, ze względu jednak na brak dostatecznej ilości preparatu nie mogliśmy powtórzyć tego doświadczenia. Dane powyższe ilustruje tabela I.

Szybkość wydzielania soku zarówno po zastosowaniu preparatu sekretyny, jak i pankreozyminy z początku w krótkim czasie wyraźnie narastała, osiągając po 1—3 min. maksimum wynoszące 0,8—1,8 ml/min, po czym wykazywała stałą tendencję spadkową, dochodząc w miarę upływu czasu do zera. Maksymalna szybkość w punkcie szczytowym była uzależniona od wielkości dawki. Nie zauważono większych różnic między krzywymi po zastosowaniu sekretyny czy pankreozyminy. Typowym przykładem omawianych zjawisk jest wykres na ryc. 1 przedstawiający krzywą szybkości wydzielania soku u psa nr 7, u którego zastosowano w osobnych wstrzyknięciach najczęściej stosowane dawki preparatów, tj. 900 j. k. sekretyny i 3 mg pankreozyminy-cholecystokininy.



Ryc. 1. Krzywa szybkości wydzielania soku trzustkowego po podaniu 900 jednostek kocich sekretyny (I) oraz 3 mg pankreozyminy-cholecystokininy (II). Pies nr 7.

Zastosowanie chlorowodoru pilokarpiny w ilości 10—15 mg wywoływało wydzielanie soku średnio po 9 minutach (6—12 min.), utrzymujące się długo, przy czym poszczególne psy zachowywały się bardzo różnorodnie tak pod względem szybkości wydzielania, jak i objętości soku, bez względu na wielkość dawki.

W wyniku oznaczeń ilości białka w poszczególnych porcjach soku wydzielonego po podaniu różnych dawek sekretyny można zauważyć, że stężenie białka jest najwyższe w pierwszej porcji lub niekiedy w pierwszych dwóch porcjach soku, a w dalszych szybko spada. Wstrzyknięcie następnej dawki sekretyny nie powoduje już dalszego wzrostu stężenia białka, lecz utrzymuje się ono w dalszych porcjach na mniej więcej stałym poziomie. W podobny sposób zmienia się wyrzut minutowy białka (tzw. *minute output*, to znaczy ilość białka wydzielona przez trzustkę w ciągu minuty) w poszczególnych porcjach soku. Zmiany wyrzutu minutowego jeszcze wyraźniej uwypuklają wzmożone wydzielanie białka w okresie czasu następującym bezpośrednio po podaniu pierwszej dawki sekretyny. W dalszych porcjach po pierwszym wstrzyknięciu i po podaniu następnych dawek sekretyny następuje ustalenie się niezmiennej szybkości wydzielania białka.

Tabela II

Stężenie i wyrzut minutowy białka w porcjach soku wydzielonego pod wpływem sekretyny, pankreozyminy i pilokarpiny.

	Nr psa	Nr porcji									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stężenie białka %	4	1,15	1,77	0,78	0,43	0,76	0,62	0,17	0,19	5,46	—
	5	2,32	1,36	0,75	0,28	—	—	—	—	15,40	—
	6	0,52	0,46	0,20	0,52	6,50	3,02	0,87	0,77	7,11	—
	7	1,19	0,58	0,37	0,56	6,07	3,90	1,53	1,15	4,54	—
	8	1,50	0,42	0,59	0,28	3,83	1,87	0,92	1,12	12,47	—
	9	1,52	0,46	0,24	0,21	0,17	0,12	3,25	1,00	0,58	13,00
	10	1,52	0,92	0,50	0,36	0,46	1,70	1,14	0,84	11,26	—
Wyrzut minutowy białka mg/min.	4	2,56	8,85	5,46	0,86	1,46	1,47	0,97	0,35	0,79	—
	5	9,28	1,81	1,36	0,62	—	—	—	—	0,51	—
	6	1,16	1,84	0,66	0,54	32,50	15,10	3,48	0,44	2,27	—
	7	3,31	3,86	1,48	1,49	30,40	39,00	4,59	1,62	4,91	—
	8	3,33	2,62	3,93	0,43	23,00	6,23	4,60	1,12	2,25	—
	9	7,60	2,30	0,40	1,05	0,77	0,24	13,90	4,00	2,18	1,91
	10	7,60	4,60	5,00	1,03	2,30	2,13	2,54	1,94	4,90	—

Dawki bodźców powodujące wydzielenie poszczególnych porcji:

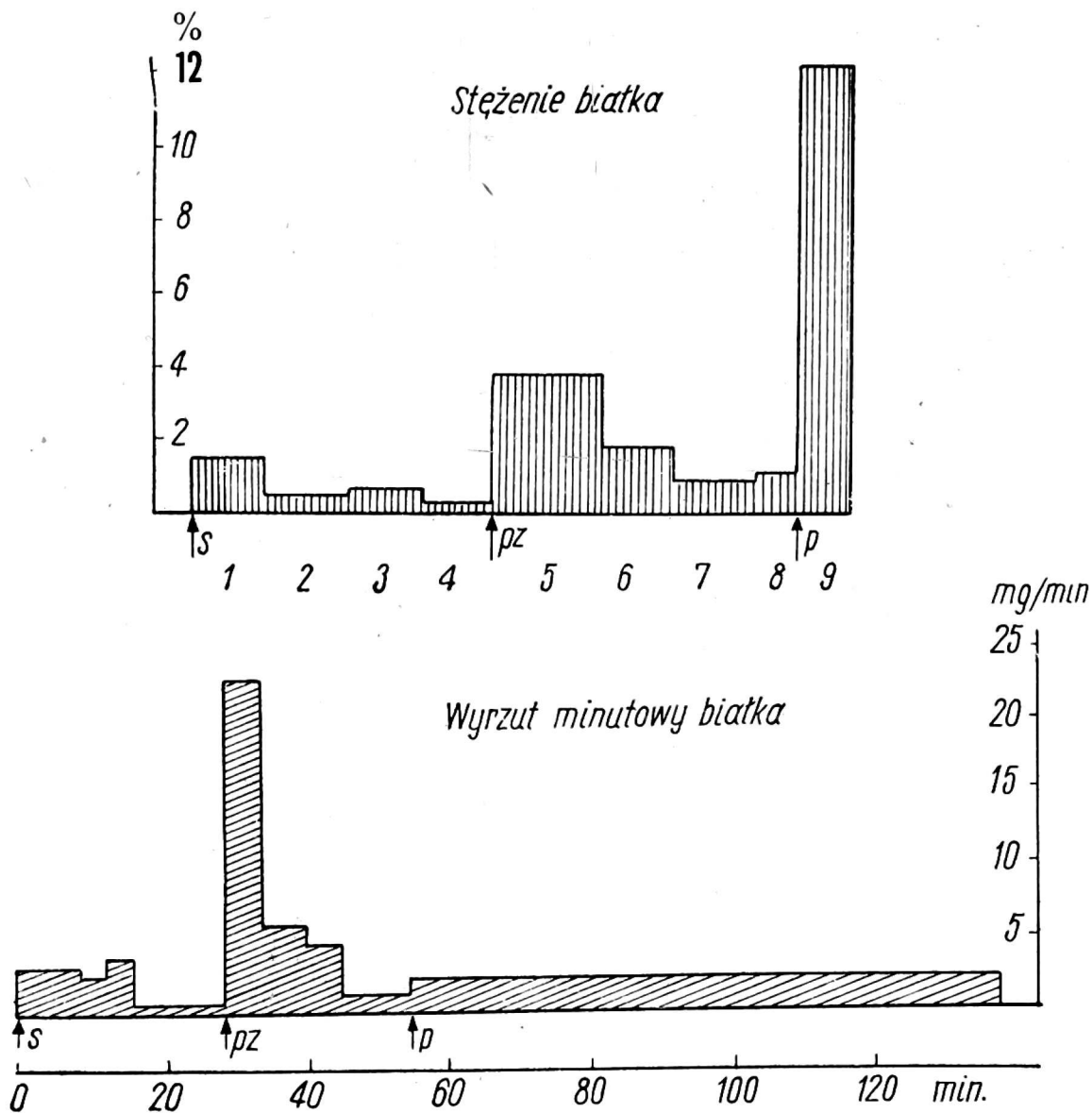
Pies nr 4 porcje 1—3 po 500 j. k. sekretyny, 4, 5 po 400 j. k., 6 po 300 j. k., 7, 8 po 500 j. k. Porcja 9 po 15 mg pilokarpiny.

Pies nr 5 porcje 1, 2 po 600 j. k. sekretyny, 3, 4 po następnych 600 j. k. sekretyny i porcja 9 po 10 mg pilokarpiny.

Psy nr 6, 7 i 8 porcje 1—4 po 900 j. k. sekretyny, porcje 5—8 po 3 mg pankreozyminy, porcja 9 po 10 mg pilokarpiny.

Pies nr 9 porcje 1—3 po 900 j. k. sekretyny, 4—6 po następnych 900 j. k. sekretyny, 7—9 po 3 mg pankreozyminy, porcja 10 po 10 mg pilokarpiny.

Pies nr 10 porcje 1—5 po 900 j. k. sekretyny, 6—8 po 500 j. k. sekretyny, + 3 mg pankreozyminy, porcja 9 po 10 mg pilokarpiny.



Ryc. 2. Wykres zmian stężenia i wyrzutu minutowego białka w porcjach soku wydzielonych pod wpływem działania trzech bodźców.

Po wstrzyknięciu preparatu pankreozyminy następuje nagły wzrost stężenia białka w pierwszej porcji i stopniowy spadek w dalszych. W identyczny sposób zmienia się w poszczególnych porcjach wyrzut minutowy białka. Stężenie białka w soku wydzielonym po pankreozyminie jest średnio trzy razy większe niż w soku po sekretynie.

Jeszcze większy wzrost stężenia białka obserwuje się po podaniu chlorowodoru pilokarpiny. Osiąga ono przeciętnie wartość cztery razy większą niż przy działaniu pankreozyminy i dwanaście razy większą niż przy działaniu sekretyny. Powyższe wyniki zebrane są w tabeli II i przedstawione na wykresie (ryc. 2), gdzie uwzględniono dane dotyczące psa nr 8.

W sposób zasadniczo równoległy do zmian stężenia białka zmienia się w poszczególnych porcjach soku, wydzielonych po podaniu określonego bodźca, stężenie wszystkich oznaczanych enzymów (tabela III). Przy kolejnym podawaniu różnych bodźców równoległość tę można obserwować jednak tylko w odniesieniu do amylazy, lipazy, aliesterazy i esterazy cholinowej. Trzykrotnemu wzrostowi stężenia białka po podaniu pankreozyminy i dwunastokrotnemu po pilokarpinie, przy stosowanej wysokości dawki, towarzyszy analogiczny wzrost stężenia tych czterech enzymów, natomiast stężenie enzymów proteolitycznych i zasadowej fosfa-

Tabela III

Stężenie i wyrzut minutowy enzymów w porcjach soku wydzielonego pod wpływem sekretyny, pankreozyminy i pilokarpiny

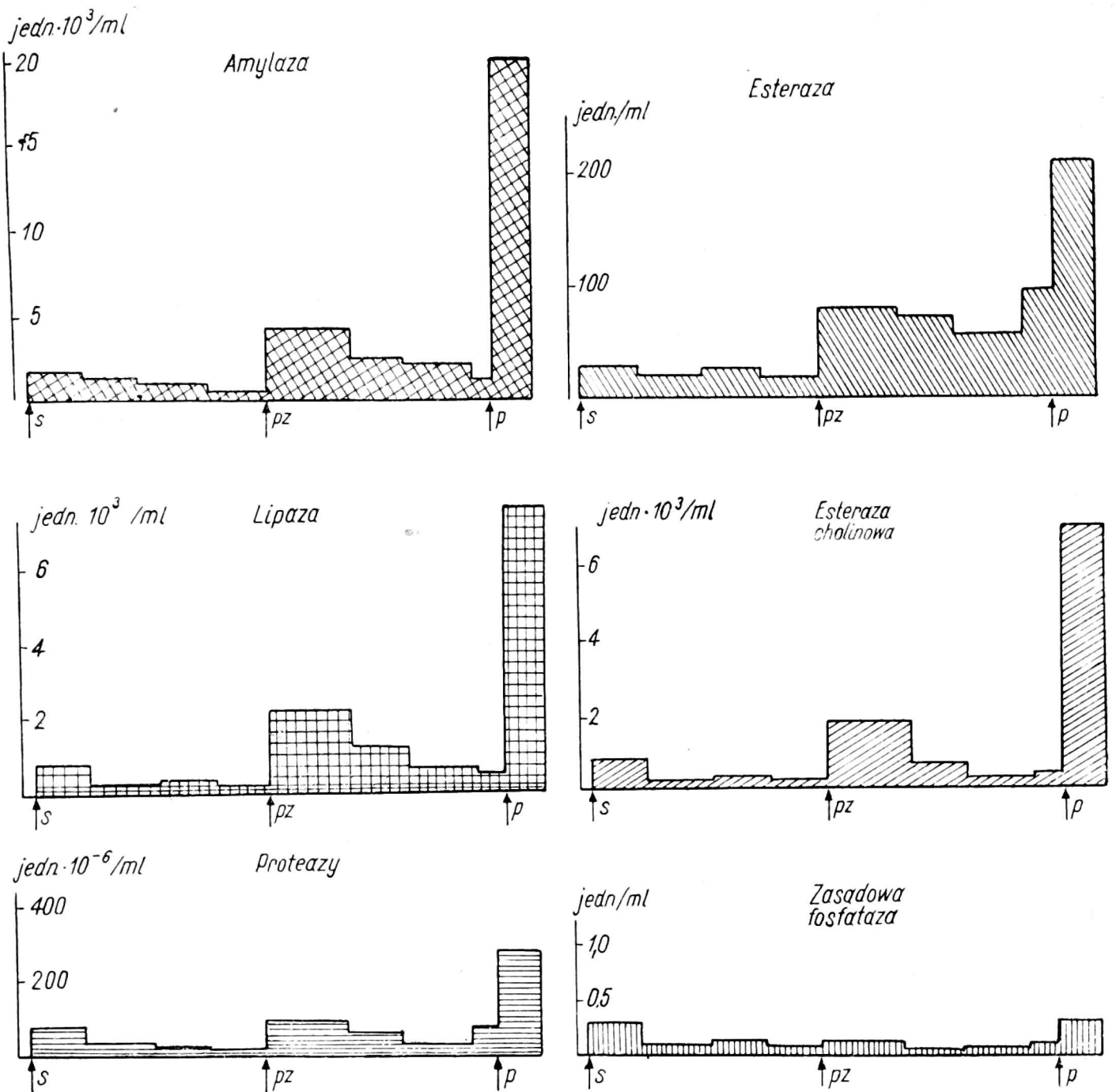
	Nr psa	Nr porcji										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Stężenie amylazy	6	790	694	382	815	—	—	5750	2561	420	1270	7215
	7	1893	704	476	862	—	—	11390	5150	2038	1250	6890
	8	1509	1081	972	238	—	—	3990	2210	1947	1192	20600
	9	1728	650	154	159	169	138	3920	1162	465	—	17480
	10	2056	1134	288	364	470	—	2550	1728	1580	—	19520
Wyrzut minutowy amylazy	6	176	278	127	84	—	—	2875	1280	152	72	230
	7	526	469	190	230	—	—	5685	5150	611	179	745
	8	335	676	648	37	—	—	2395	736	973	119	372
	9	864	325	26	78	77	55	1680	465	174	—	257
	10	684	567	288	104	235	—	319	384	365	—	848
Stężenie lipazy	6	131	93	58	99	—	—	1460	920	450	255	2310
	7	608	371	211	314	—	—	3125	1972	1122	725	2800
	8	704	138	278	70	—	—	2160	1120	525	393	7600
	9	1074	410	102	96	74	51	2182	940	445	—	12500
	10	605	570	426	381	493	—	1340	915	885	—	11710
Wyrzut minutowy lipazy	6	29	37	19	10	—	—	730	460	164	14	74
	7	169	248	84	84	—	—	1562	1972	336	103	303
	8	157	86	185	11	—	—	1294	373	263	40	137
	9	537	205	17	48	34	21	935	376	167	—	184
	10	202	285	426	109	246	—	168	204	204	—	509
Stężenie proteaz	6	230	393	176	450	—	—	276	100	33	117	—
	7	69	87	64	31	—	—	119	91	23	23	89
	8	68	27	22	4	—	—	95	55	20	63	272
	9	63	36	25	22	8	3	57	7	17	—	189
	10	515	250	86	48	8	—	24	21	15	—	208
Wyrzut minutowy proteaz	6	51	157	59	47	—	—	138	50	12	7	—
	7	19	58	25	8	—	—	60	92	7	3	10
	8	15	17	14	2	—	—	57	18	10	6	5
	9	31	18	4	11	4	1	27	3	7	—	3
	10	172	125	86	15	4	—	3	5	4	—	9
Stężenie zasadowej fosfatazy	6	141	111	58	154	—	—	156	88	84	106	160
	7	216	124	82	144	—	—	176	119	62	54	204
	8	258	90	104	86	—	—	109	38	50	108	278
	9	325	124	75	90	82	48	146	75	84	—	236
	10	304	173	88	102	139	—	98	78	118	—	148

Tabela III (ciąg dalszy)

	Nr psa	Nr porcji										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Wyrzut minutowy zasadowej fosfatazy	6	31	44	19	15	—	—	78	44	30	6	5
	7	60	79	33	38	—	—	88	119	19	8	22
	8	57	56	69	13	—	—	65	13	25	11	5
	9	162	62	13	45	37	19	63	30	32	—	4
	10	101	86	88	29	68	—	12	17	27	—	6
Stężenie esterazy	6	1,1	0,6	0,5	1,9	—	—	73,5	64,0	51,5	26,8	175,5
	7	16,5	13,2	12,4	12,0	—	—	58,3	33,2	21,4	13,0	75,0
	8	24,8	16,5	21,3	12,8	—	—	75,0	66,0	53,0	92,8	205,0
	9	18,6	6,4	2,9	3,1	3,0	1,9	29,5	8,3	6,8	—	75,0
	10	36,8	18,6	12,8	8,6	10,3	—	60,5	27,5	15,0	—	155,0
Wyrzut minutowy esterazy	6	0,2	0,3	0,2	0,2	—	—	36,8	32,0	18,7	1,5	5,6
	7	4,6	3,8	4,9	3,2	—	—	29,2	33,2	6,4	1,9	8,1
	8	5,5	10,3	14,2	1,9	—	—	45,0	22,0	26,5	9,3	3,7
	9	9,3	3,2	0,5	1,5	1,4	0,8	12,7	3,3	2,5	—	1,1
	10	12,3	9,3	12,8	2,5	5,1	—	7,6	6,1	3,5	—	6,7
Stężenie esterazy cholinowej	6	48	26	10	42	—	—	4050	1000	130	155	1770
	7	489	154	99	144	—	—	5240	2400	558	267	2630
	8	704	64	154	74	—	—	1640	560	135	198	6830
	9	1070	170	32	41	32	—	2500	355	190	—	7500
	10	993	496	176	166	265	—	889	440	475	—	9880
Wyrzut minutowy esterazy cholinowej	6	11	10	3	4	—	—	2025	500	47	9	57
	7	136	103	40	38	—	—	2620	2400	168	38	284
	8	157	40	103	11	—	—	984	187	68	20	123
	9	535	85	5	20	15	—	1070	142	71	—	110
	10	496	248	176	47	132	—	111	98	110	—	430

Porcje 1—6 zostały wydzielone po wstrzyknięciu sekretyny w ilościach podanych w tabeli II, porcje 7—10 po podaniu 3 mg pankreozyminy, porcja 11 po podaniu 10 lub 15 mg pilokarpiny. Stężenie enzymów wyrażono w jednostkach aktywności na 1 ml soku, wyrzut minutowy w jednostkach aktywności na minutę. Wartości dla proteaz podano w jednostkach $\cdot 10^{-6}$, dla zasadowej fosfatazy w jednostkach $\cdot 10^{-3}$.

tazy pozostaje na tym samym poziomie co w soku sekretynowym. Również wyrzut minutowy tych dwóch enzymów pozostaje przeciętnie na tym samym poziomie, niezależnie od rodzaju bodźca, w odróżnieniu od wyrzutu białka i pozostałych badanych enzymów (wykresy na ryc. 3). Różnice te występują jeszcze wyraźniej przy obliczeniu stosunku ilości enzymu do ilości białka, czyli aktywności właściwej dla poszczególnych enzymów w porcjach soku (tabela IV). W przypadku amylazy, lipazy,



Ryc. 3. Wykres zmian stężenia enzymów w porcjach soku wydzielonych pod wpływem działania trzech bodźców

Tabela IV

Zestawienie wartości średnich aktywności właściwej enzymów w porcjach soku wydzielonych po podaniu różnych bodźców

Enzym Bodziec	Amylaza	Lipaza	Proteazy	Zasa- dowa fosfataza	Alieste- raza	Esteraza cholino- wa
Sekretyna	150 ± 8	45 ± 3	20,7 ± 2,7	28,5 ± 1,4	1,9 ± 0,1	34 ± 3
Pankreozymina	124 ± 7	56 ± 4	2,6 ± 0,2	4,5 ± 0,5	2,7 ± 0,4	41 ± 4
Sekretyna + pankreozymina	163 ± 8	88 ± 6	1,7 ± 0,1	8,5 ± 1,7	2,6 ± 0,4	49 ± 3
Pilokarpina	146 ± 9	60 ± 8	1,9 ± 0,1	2,4 ± 0,3	1,3 ± 0,2	60 ± 7

aliesterazy i esterazy cholinowej aktywność właściwa pozostaje na stałym poziomie, przy niewielkich tylko wahaniach, w przypadku wszystkich stosowanych bodźców. Aktywność właściwa zasadowej fosfatazy i proteaz jest około pięciokrotnie niższa po zastosowaniu pobudzania pankreozymina i dziesięciokrotnie niższa przy działaniu pilokarpiny w porównaniu z sokiem sekretynowym. Przy równoczesnym podaniu sekretyny i pankreozyminy, co zastosowano w jednym doświadczeniu, zmiany stężenia białka i enzymów w poszczególnych porcjach przebiegały według tego samego schematu, jakkolwiek wzrost stężenia w pierwszej porcji po wstrzyknięciu sekretyny i pankreozyminy był mniejszy niż w analogicznych porcjach przy podawaniu samego preparatu pankreozyminy.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wyniki uzyskane w doświadczeniach z użyciem oczyszczonych preparatów sekretyny są na ogół zgodne z obserwacjami innych autorów. Dotyczy to zarówno czasu trwania wydzielania, przebiegu procesu wydzielniczego oraz zachowania się białka i enzymów w soku trzustkowym. Zmiany stężenia białka oraz enzymów obserwowane przy podawaniu sekretyny potwierdzają pogląd uznawany przez większość badaczy, że sekretyna jest czynnikiem mobilizującym wydzielanie wody, natomiast nie pobudza wydzielania białka i enzymów (16, 22). Wyższe stężenie białka obserwowane w początkowych porcjach daje się logicznie wytłumaczyć wypłukiwaniem białka nagromadzonego w przewodach trzustki, wyprodukowanego w okresie poprzedzającym proces wydzielania (2). W dalszych porcjach stężenie białka osiąga stałą wartość, ponieważ jest ono przypuszczalnie produkowane w trzustce ze stałą podstawową szybkością. Uwypukla się to szczególnie w doświadczeniach z wielokrotnym podawaniem sekretyny.

Podawanie używanego przez nas preparatu pankreozyminy-cholecystokininy powodowało wydzielanie soku trzustkowego o objętości i czasie trwania zbliżonych do tych, które uzyskiwano po zastosowaniu pobudzania sekretyną. Wynik ten różni się od obserwacji poczynionych przy stosowaniu pojedynczych dawek pankreozyminy na tle stałego podawania sekretyny, przeprowadzonych przez *Wanga* i wsp. (22). Równoczesne podanie sekretyny i pankreozyminy zastosowane w jednym doświadczeniu nie spowodowało żadnego wzrostu objętości wydzielonego soku, jak należałoby się spodziewać po obserwacjach poczynionych po zastosowaniu tych preparatów oddzielnie. Można by stąd wnioskować, że taki sposób podania pankreozyminy nie wpływa na wzrost objętości wydzielonego soku, co również podają cytowani autorzy.

Co się tyczy pobudzania wydzielania białka i niektórych enzymów przez pankreozyminę, to stwierdziliśmy całkowitą zgodność naszych wyników z wynikami publikowanymi dotychczas (7, 16, 22), natomiast obserwacje nasze wykazały, że pogląd na równoległość wydzielania trzech głównych enzymów w soku trzustkowym nie jest słuszny. Spośród przebadanych enzymów można wyodrębnić dwie grupy: pierwsza, do której należą amylaza, lipaza, aliesteraza i esteraza cholinowa, wydzielana jest przy wszystkich stosowanych bodźcach w ilościach proporcjonalnych do ilości białka. Do drugiej grupy należą zasadowa fosfataza

i enzymy proteolityczne, których stężenie, bez względu na rodzaj użytego bodźca, pozostaje na tym samym poziomie. W dotychczasowym piśmiennictwie tego rodzaju różnicę stwierdzono tylko między amylazą i zasadową fosfatazą (22). Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń z użyciem pilokarpiny, jako przedstawiciela bodźców parasympatykometycznych, można stwierdzić analogię między działaniem tego bodźca i pankreozyminy.

Obserwacje powyższe wykazują więc, że nie można uważać poziomu stężenia białka w soku trzustkowym za wykładnik aktywności poszczególnych jego enzymów, co zgadza się z wynikami uzyskanymi przez Komarova i wsp. (15) oraz Gutha i wsp. (6). Również z oznaczeń aktywności jednego enzymu nie można wnioskować o aktywności pozostałych. Dane te stanowią jeszcze jedną podstawę do potwierdzenia zależności składu enzymatycznego soku od rodzaju zastosowanego bodźca.

Autorzy pragną wyrazić podziękowanie Prof. B. Skarżyńskiemu za pomoc i kierownictwo pracą, oraz Prof. Eric'owi Jarpes za dostarczenie niezbędnych preparatów.

Г. Хоманьска - Шафран, Я. Олексы, З. Шафран

ВЛИЯНИЕ ОЧИЩЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ СЕКРЕТИНА И ПАНКРЕОЗИМИНА РАВНО КАК ПИЛОКАРПИНА НА ВЫДЕЛЕНИЕ ЭНЗИМОВ В ПАНКРЕАТИЧЕСКОМ СОКЕ СОБАКИ

Содержание

Авторы исследовали сок выделявшийся у собаки с панкреатической фистулой под влиянием различных возбудителей: секретина, панкреозимина — холецистокинина и пилокарпина. Исследовались: объем сока, время выделения, количество выделенного белка и концентрация 6 различных энзимов, содержащихся в соке. Согласно прежним исследованиям американских авторов, найдено, что секретин действует лишь в качестве возбудителя, вымывающего белки и энзимы, накопленные в железистых клетках, но панкреозимин и пилокарпин усиливают продукцию энзиматически активного белка. Концентрация энзимов в панкреатическом соке после панкреозимина и пилокарпина резко возрастает, но взаимное количественное соотношение отдельных энзимов панкреатического сока после введения панкреозимина и пилокарпина представляется иначе, чем после секретина.

H. Homańska-Szafrańska, J. Oleksy, Z. Szafrańska

THE INFLUENCE OF PURIFIED PREPARATIONS OF SECRETINE, PANCREOZYMIN AND PILOCARPINE ON THE SECRETION OF ENZYMES IN THE PANCREATIC JUICE IN A DOG

Summary

The authors investigated the juice excreted by a dog with acute pancreatic fistula under the influence of different stimuli: secretine, pancreozymin — cholecystokinine and pilocarpine. The amount of the juice, the duration of secretion, the amount of emitted protein and the concentration of the six different enzymes

in the juice were examined. In agreement with the previous studies of American investigators it was stated that secretine acts only as a stimulus rinsing out protein and the enzymes which accumulated in the glandular cells, but pancreozymin and pilocarpine increases the production of enzymatically active protein. The concentration of enzymes in pancreatic juice after pancreozymin and pilocarpine rises markedly but the quantitative proportion of the individual enzymes of pancreatic juice after pancreozymin and pilocarpine is different than after secretine.

PIŚMIENNICTWO

1. Anson M. L.: *J. Gen. Physiol.*, 1938, 22, 79. — 2. Babkin P. B.: *Secretory Mechanism of the Digestive Glands*, Hoeber B. P., New York 1950. — 3. Byrne G. M., Phinney J. J., Schachter M., Gordon-Young E.: *J. Biol. Chem.*, 1951, 196, 683. — 4. Fister H.: *Manual of Standardized Procedures for Spectrophotometric Chemistry*, New York 1950. — 5. Folin O., Ciocalteu V.: *J. Biol. Chem.* 1927, 73, 627. — 6. Guth P. H., Komarov S. A., Shay H., Style C. Z.: *Am. J. Physiol.*, 1956, 187, 207. — 7. Harper A. A., Raper H. S.: *J. Physiol.*, 1943, 102, 115. — 8. Hestrin S.: *J. Biol. Chem.*, 1945, 180, 249. — 9. Homańska-Szafrańska H., Oleksy J.: *Acta Biochim. Pol.*, 1956, 3, 663. — 10. Huggins C., Lapidus J.: *J. Biol. Chem.*, 1947, 170, 467.
11. Huggins C., Talalay P.: *J. Biol. Chem.*, 1945, 159, 399. — 12. Jorpes E., Mutt V.: *Arkiv E. Kemi*, 1954, 7, 553. — 13. Jorpes E., Mutt V.: *Arkiv E. Kemi*, 1953, 6, 273. — 14. Jorpes E., Mutt V.: *Nature*, 1953, 172, 124. — 15. Komarov S. A., Siple H., Shay H., Style C. Z.: *Federation Proc.*, 1954, 13, 81. — 16. Lin T. M., Grossman M. J.: *Am. J. Physiol.*, 1956, 186, 52. — 17. Linhardt K., Walter K., Hoppe-Seyler Z.: 1952, 289, 245. — 18. McCance R. A., Brown L. M., Comline R. S., Titchen D. A.: *Nature*, 1951, 168, 788. — 19. Munro M. P., Thomas J. E.: *Am. J. Physiol.*, 1945, 145, 140. — 20. Northrop J. H., Kunitz M., Herriot R. M.: *Crystalline Enzymes*, Columbia Univ. Press. New York 1948.
21. Perez M., Willemort R.: *Ann. Pharm. Franc.*, 1953, 11, 608. — 22. Wang C. C., Grossman M. J., Ivy A. C.: *Am. J. Physiol.*, 1948, 154, 358.

Otrzymano dnia 7. IX. 1957 r.