

Medicinski fakultet, Beograd
 Institut za patološku fiziologiju¹
 Institut za medicinska istraživanja²

Originalni naučni rad
Original study
 UDK 612.33/35.085:599.323.4

MORFOMETRIJSKE I IMUNOHISTOHEMIJSKE OSOBINE CCK-ĆELIJA TANKOG CREVA KOD PACOVA SA PORTOKAVNIM ŠANTOM

MORPHOMETRIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PATTERNS OF DUODENAL CCK-CELLS IN RATS WITH PORTACAVAL SHUNTS

Tatjana RADOSAVLJEVIĆ¹, Vera TODOROVIĆ², Danijela VUČEVIĆ¹ i Branka ŠIKIĆ¹

Sažetak - Terminolateralni portokavni šant se smatra eksperimentalnim modelom hronične i umerene insuficijencije jetre, te pored poremećaja funkcije jetre dovodi i do njenih morfoloških promena, odnosno atrofije jetre. Pored ovih, promene se dešavaju u pankreasu i tankom crevu. Jetra ima značajnu ulogu u metabolizmu i eliminaciji većine gastrointestinalnih hormona, uključujući i holecistokinin (CCK). CCK-peptidi (CCK-8 i CCK-22) putem portne vene prolaze kroz jetru, pre nego što dospeju u sistemsku cirkulaciju i do ciljnih tkiva. U ovom radu je kod pacova sa portokavnim šantom dokazana povećana ćelijska gustina i funkcionalna aktivnost CCK8-produbujućih ćelija u duodenumu što bi se moglo dovesti u vezu sa trofičnim efektom CCK na egzokrinu pankreas.

Ključne reči: Pacovi; Holecistokinin; Tanko crevo; Imunohistohemija; Hirurški porta-kavni šant; Eksperimentalna ciroza jetre

Uvod

Terminolateralni portokavni šant (PKŠ) izveden na pacovima predstavlja podesan eksperimentalni model hronične, umerene insuficijencije jetre, pri čemu se razvija funkcionalno oštećenje jetre praćeno brojnim metaboličkim i endokrinološkim poremećajima [1-9]. Usled kompletnog skretanja portne krvi od jetre razvijaju se i morfološke promene jetre praćene atrofijom i nodularnom regeneracijom hepatocita [2,4,9].

Jetra ima značajnu ulogu u metabolizmu i eliminaciji većine gastrointestinalnih hormona uključujući i holecistokinin (CCK). U cirozi jetre oštećeno je oslobađanje i/ili rezistencija na peptide creva kao što su glukagonu-sličan peptid-1 (GLP-1), gastrični inhibitorni polipeptid (GIP) i CCK, čime se pri povećanim koncentracijama ovih peptida u krvi objašnjava poremećena sekrecija insulina posle oralnog opterećenja glukozom [10].

CCK sintetišu I-ćelije koje su najbrojnije u duodenumu i proksimalnom jejunumu, a broj im se smanjuje u distalnim delovima tankog creva. Pored ovih ćelija, CCK sintetišu neuroni gastrointestinalnog trakta (GIT), tako da CCK deluje i kao hormon i/ili kao neuropeptid. Ovaj hormon pripada familiji peptida osovine mozak-crevo [11,12]. Imunohistohemijskim ispitivanjem endokrinog pankreasa pacova dokazano je postojanje CCK-ćelija. CCK-slična imunoreaktivnost nađena je u centru ostrvca endokrinog pankreasa, kolokalizovana sa insulinom u β-ćelijama, a glavna molekularna forma CCK je CCK-8 [13].

CCK ostvaruje svoje dejstvo u GIT preko perifernih receptora (CCK-A), a u mozgu i perifernim nervima preko centralnih receptora (CCK-B/gastrin) [11,12,14,15]. Pored brojnih bioloških dejstava CCK, [11,12,16] stimuliše glukozno-zavisnu sekreciju insulina, jer je dokazano postojanje receptora

za CCK na β-ćelijama Langerhansovih ostrvaca. Insulinotropna aktivnost C-terminalnog dela CCK-8 zasniva se na aktivaciji fosfolipaze C, hidrolizi fosfatidil-inozitola i stvaranju sekundarnih *messenger* diacilglicerola (DAG) i inozitol-3-fosfata (IP3) [17,18]. Drugi mehanizam je signalni put fosfolipaza A2-arahidonska kiselina, jer je dokazano da arahidonska kiselina povećava preuzimanje ekstracelularnog Ca²⁺ i oslobađanje intracelularnog Ca²⁺ iz skladišta, reguliše aktivnost protein kinaze C značajne za egzocitozu i olakšava fuziju sekretornih granula sa membranom β-ćelije omogućavajući egzocitozu [19]. Precizna uloga CCK u regulaciji sekrecije insulina i glukagona još uvek je nedovoljno jasna, ali nesumnjivo uključuje kompleksnu integraciju dejstava neuralnih i humoralnih puteva, kao i različite forme CCK [12].

Regulacija sekrecije CCK odvija se i preko sekrecije tripsin-senzitivnih peptida: *monitor* peptid iz pankreasa i CCK-releasing faktor (tripsin-senzitivna supstancija) iz creva koji izlučeni u lumen creva deluju na endokrine ćelije koje sintetišu CCK [11,20].

Zbog oštećene funkcionalne aktivnosti hepatocita u PKŠ i poznate uloge jetre u metabolizmu i eliminaciji CCK, "odložena" eliminacija CCK iz cirkulacije mogla bi biti odgovorna za veću aktivaciju CCK-A receptora. U eksperimentalnoj cirozi jetre kod pacova pokazano je da je povećanje koncentracije CCK u plazmi odgovorno za hiperfunkciju i hiperplaziju pankreasa. Stoga je cilj ovog istraživanja bio da se ispituju imunohistohemijske i morfolometrijske osobine CCK-ćelija tankog creva kod pacova sa PKŠ.

Materijal i metode

U eksperimentima su korišćeni mužjaci pacova Wistar soja, telesne mase 180-250 grama. Životinje

Skraćenice

CCK	- holecistokinin
PKŠ	- portokavni šant
GLP	- l-glukagonu-sličan peptid-1
GIP	- gastrični inhibicioni polipeptid
GIT	- gastrointestinalni trakt
DAG	- diacilglicerol
IP3	- inozitol-3-fosfat
PAP	- peroksidaza-anti-peroksidaza
DNK	- dezoksiribonukleinska kiselina
RNK	- ribonukleinska kiselina
GRP	- peptid koji oslobađa gastrin
Ca ²⁺	- kalcijumov jon

su čuvane u pojedinačnim kavezima i hranjene standardnom briketiranom hranom uz slobodan pristup vodi. U prostoriji gde su smeštene održavani su optimalna temperatura (21-23°C) i vlažnost vazduha. Životinje su podeljene u dve grupe: PKŠ - eksperimentalna grupa životinja na kojima je izveden PKŠ; (n = 27) i K - kontrolna grupa neoperisanih životinja; (n = 11).

Hirurška tehnika PKŠ

Kao model za dobijanje hronične insuficijencije jetre korišćena je hirurška tehnika terminolateralne (*end-to-side*) portokavne anastomoze po Lee i Fisheru [21], koju je modifikovao Bismuth i saradnici [1]. Operacija je izvedena u sterilnim uslovima, uz pomoć lupe sa ugrađenim svetlom (uvećanje 2,5 puta). Za vreme operacije životinje su bile pod etarskom anestezijom. Osam nedelja nakon operacije, životinje su žrtvovane, a zatim su merene težine jetre i pankreasa i uzimani uzorci odgovarajućih segmenata tankog creva za morfometrijsko i imunohistohemijsko dokazivanje CCK-ćelija. Takođe, isecci tkiva pankreasa su korišćeni za patohistološka ispitivanja.

Imunohistohemijske tehnike

Peroksidaza-anti-peroksidaza (PAP). Za detekciju CCK8-imunoreaktivnih ćelija u tankom crevu korišćena je PAP tehnika po Stenbergeru.

Nakon deparafinizacije i blokiranja endogene peroksidaze 0,3% H₂O₂ u metanolu, tkivni preseki su inkubirani u 10% normalnom svinjskom serumu na sobnoj temperaturi, 30 minuta. Potom je blokirajući serum odliven, a inkubacija je nastavljena u primarnom antiserumu (DAKO, Denmark, Code No. A0568) preko noći na 4°C. Na preparate je potom nanet svinjski anti-zečji IgG antiserum u razblaženju 1:300 u toku 45 min na 22°C. Konačno, preparati su inkubirani u zečjem PAP kompleksu (razblaženje 1:50) u toku 45 minuta na 22°C. Vizualizacija imunoreaktivnih mesta vršena je u rastvoru DAB-HCl/H₂O₂ (0,7 mM 3,3-diamino-benzidin - HCl/0,002% H₂O₂) u TRIS-HCl puferu pH 7,6, 5 min. Kao opšti rastvarač antiseruma i sredstvo za ispiranje između različitih koraka u toku imunohistohemijske procedure bojenja, korišćen je 0,01 M

fosfatni pufer pH 7,4. Jedra su kontrastirana Maye-rovim hematoksilinom.

Morfometrijske analize na nivou optičke mikroskopije

Iz serije uzoraka duodenuma, jejunuma i ileuma po tri preseka međusobnog rastojanja od 50 µm obojena imunohistohemijskom metodom korišćena su za konvencionalnu morfometrijsku analizu broja CCK-imunoreaktivnih ćelija [22].

Statistička obrada rezultata

U statističkoj obradi podataka korišćeni su Studentov t-test i *Manney-Whitney* test.

Rezultati

Promene u težini jetre i pankreasa operisanih životinja u odnosu na kontrolnu neoperisanu grupu prikazane su u Tabeli 1. Rezultati pokazuju da su životinje sa PKŠ na kraju eksperimentalnog perioda (osam nedelja od operacije) imale znatno redukovanu težinu jetre, kako izraženu u apsolutnoj vrednosti tako i relativnu težinu, u poređenju sa kontrolnim neoperisanim životinjama ($p < 0,01$). Nasuprot tome, vrednosti apsolutne ($p < 0,01$) i relativne ($p < 0,05$) težine pankreasa bile su znatno više kod operisanih životinja sa PKŠ u odnosu na kontrolne neoperisane životinje.

Tabela 1. Apsolutna i relativna težina jetre i pankreasa na kraju eksperimenta

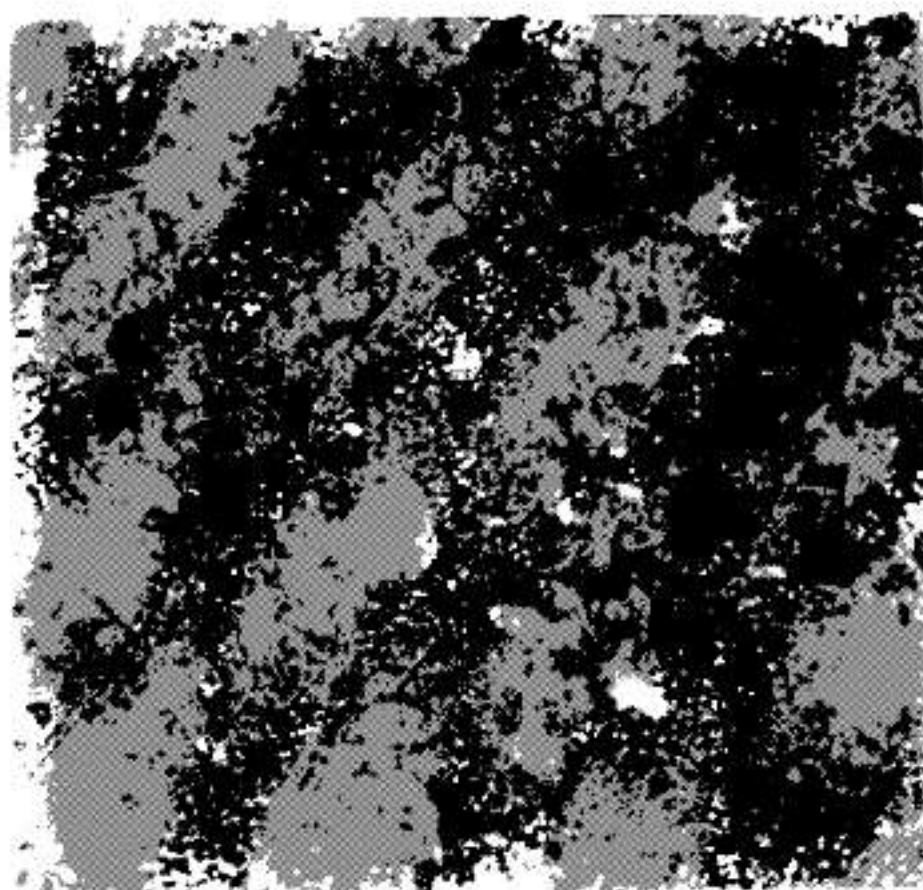
Table 1. Absolute and relative weight of liver and pancreas at the end of the experiment

Grupa životinja Animal group	Težina jetre/Liver weight		Težina pankreasa Pancreatic weight	
	Apsolutna (g) Absolute (g)	Relativna (%) Tq/Relative (% Tq)	Apsolutna (g) Absolute (g)	Relativna (%) Tq/Relative (% Tq)
K (n=11)	6,94 ± 1,34	2,95 ± 0,48	0,77 ± 0,27	0,33 ± 0,11
C (n=11)				
PKŠ (n=27)	5,12 ±	2,15 ±	1,12 ±	0,49 ± 0,17*
PCS (n=27)	1,22**	0,25**	0,38**	

** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

U egzokrinom delu pankreasa životinja sa PKŠ uočavala se diskretna do umerena hipertrofija acinusnih ćelija. Retko su bile prisutne fokalne zone parenhimske degeneracije, nekroze i fibroze. Postojala je umerena steatoza (Slika 1). Arteriole su bile zadebljale zidova. U kanalicima se nisu uočavali proteinski cilindri i konkrementi.

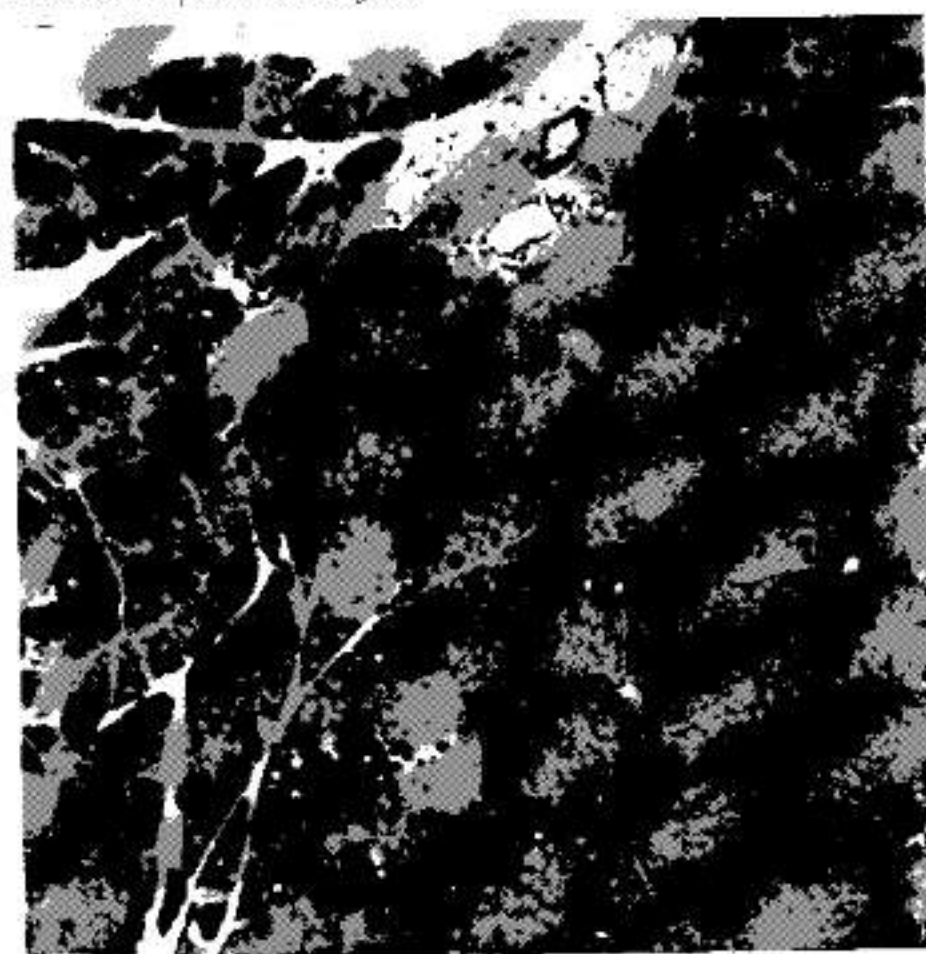
Ostrvca su pokazivala građu tipičnu za jukstaplenični deo pankreasa (dorzalni primordium), sa karakterističnim rasporedom i brojanjem odnosom pojedinih tipova endokrinih ćelija (Slika 2). Krvni sudovi ostrvaca bili su dilatirani. Na rutinski obojenim (hematoksilin-eozinom) preparatima pankreasa nije bilo uočljive proliferacije ili skleroze ostrvaca, kao ni perisinusoidne fibroze. Takođe, nisu primećeni znaci ćelijskog oštećenja u



Slika 1. Pankreas životinje sa PKS. Uočiti lipidne kapi u acinusnim ćelijama. Polutanki presek; toluidin plavo, x20

Fig. 1. Pancreas of the animal with portocaval shunt (PCS). Lipid droplets in acinus can be observed. Semithin section, toluidine blue, x 20

ostrvcima, inflamacijske reakcije i *de novo* formiranja endokrinih ćelija van ostrvaca (duktulo-insularna proliferacija).



Slika 2. Juktasplenični deo pankreasa životinje sa PKS. Karakterističan izgled, raspored i veličina Langerhansovih ostrvaca. Polutanki presek; toluidin plavo, x20.

Fig. 2. Juxtasplenic region of the pancreas in the animal with PCS. Typical pattern, distribution and size of Langerhans islets. Semithin section, toluidine blue, x 20

Tabela 2. Morfometrijska analiza CCK8-imunoreaktivnih enteroendokrinih ćelija u različitim segmentima tankog creva ispitivanih životinja

Table 2. Morphometric analysis of CCK-8-immunoreactive enteroendocrine cells in different segments of the small intestine of investigated animals

Broj CCK-8-prodajućih endokrinih ćelija/1000 epitelnih ćelija mukoze/Number of CCK-8-producing mucosal epithelial cells/1000 of epithelial mucosal cells			
	Duodenum/Duodenum	Jejunum/Jejunum	Ileum/Ileum
K (n=11)			
C (n=11)	5.0±0.7	4.4±0.4	3.2±0.7
PKŠ (n=27)			
PCS (n=27)	7.2±0.4**	5.6±0.3*	3.1±0.6

* p<0.05; ** p<0.01

Morfometrijska analiza brojnosti CCK8-imunoreaktivnih ćelija u različitim segmentima tankog creva ispitivanih životinja prikazana je u Tabeli 2. Rezultati ultrastrukturnog ispitivanja endokrinih ćelija tankog creva operisanih životinja sa PKS i kontrolnih neoperisanih životinja prikazani su u Tabeli 3.

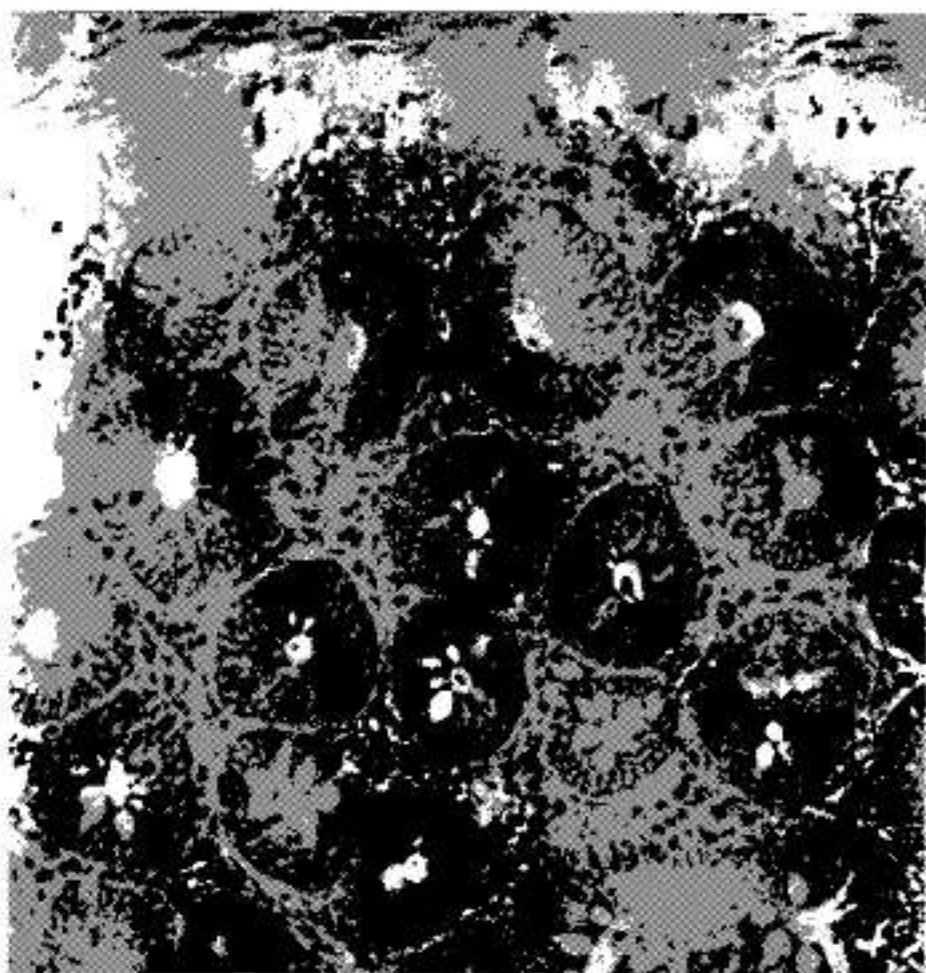
Tabela 3. Ultrastrukturna analiza I ćelija tankog creva ispitivanih životinja

Table 3. Ultrastructural analysis of duodenal I-cells in the investigated animals

Ultrastrukturne karakteristike sekretornih granula I ćelija Ultrastructural pattern of secretory granules of I-cells	
K/C	Promera 240-300 nm; okrugle; umereno gusto osmofilno središte i blisko nalegla membrana/240-300 nm in diameter, round cells; moderate density of the osmiophilic granule and closely related membrane
PKŠ/PCS	Iste osnovne karakteristike kao kod kontrolnih životinja, ali sa brojnijim granulama koje imaju izrazito gusto osmofilno središte/The same common features as in control animals, but these cells have a great number of granules with prominent dense osmiophilic globules

U obe ispitivane grupe životinja morfometrijska analiza CCK8-prodajućih ćelija, markiranih imunohistohemijski, pokazala je karakterističnu distribuciju kako duž različitih segmenata tankog creva, tako i u odnosu na osovinu vilus-kripta. Naime, ove ćelije su najbrojnije u duodenumu i pretežno su lokalizovane u bazalnom delu kripta. Međutim, u duodenumu životinja sa PKS došlo je do značajnog povećanja brojnosti ovih ćelija u odnosu na kontrolne neoperisane životinje (slike 3, 4).

Elektronskomikroskopska studija je pokazala da su I ćelije tankog creva u obe grupe ispitivanih životinja imale generalno nenarušenu ultrastrukturnu građu. Naime, CCK8-prodajuće ćelije su enteroendokrine ćelije otvorenog tipa sa karakterističnim okruglim sekretornim granulama promera 240-300 nm, umereno gustog osmofilnog središta i blisko nalegla granične membrane. Kod životinja sa PKS I ćelije tankog creva su imale iste osnovne ultrastrukturne karakteristike ali sa daleko brojnijim



Slike 3 i 4. CCK-8-prodjujuće ćelije ($\Rightarrow$) u duodenumu kontrolne životinje (levo) i životinje sa PKS (desno). Uočiti veću brojnost ćelija kod životinje sa PKS. PAP, x40 (levo) i x20 (desno)

Fig. 3 and 4. CCK-8-producing cells ($\Rightarrow$) in the duodenum of the control animal (left) and animal with PCS (right). PAP, x40 (left) and x20 (right). Numerous CCK-8 producing cells in the animal with PCS can be seen

citoplazmatskim sekretornim granulama izrazito gustog osmiofilnog središta.

Diskusija

Terminolateralni PKS se smatra eksperimentalnim modelom hronične i umerene insuficijencije jetre, te pored poremećaja funkcije jetre [2-8] dovodi i do njenih morfoloških promena [9,23]. Takođe, poremećaji nastaju i u pankreasu, kao i u tankom crevu [24,25].

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su životinje sa PKS na kraju eksperimentalnog perioda (osam nedelja od operacije) imale znatno redukovanu težinu jetre, izraženu kako u apsolutnoj vrednosti tako i relativnu težinu, u poređenju sa kontrolnim neoperisanim životinjama. I drugi autori u PKS najčešće opisuju atrofiju jetre u pacova, pasa i čoveka [4,9,23].

Vrednosti apsolutne i relativne težine pankreasa bile su znatno više kod operisanih životinja sa PKS u odnosu na kontrolne neoperisane životinje. Pored uticaja na egzokrinu sekreciju pankreasa, pokazano je da CCK stimuliše rast ovog organa. Smatra se da je ovaj efekat fiziološki, s obzirom da uzimanje *per os* inhibitora tripsina, koji stimuliše oslobađanje endogenog CCK dovodi do rasta pankreasa, a da tretiranje životinja sa antagonistima receptora za CCK izaziva njegovu atrofiju. Među GII hormonima, CCK i gastrin stimulišu rast pankreasa preko CCK-A receptora uzrokujući hipertrofiju i hiperplaziju, odnosno povećanje težine pankreasa povećanjem

sadržaja dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) i ribonukleinske kiseline (RNK) [14]. Rast pankreasa je rezultat hipertrofije i hiperplazije acinusnih ćelija, što se odražava povećanjem težine organa, povećanim sadržajem enzima, ukupne RNK i DNK, i povećanom inkorporacijom timidina. Uz to, dokazano je da tretman egzogenim CCK ubrzava regeneraciju pankreasa nakon pankreatitisa izazvanog davanjem etionina i da je endogeni CCK uključen u regeneraciju pankreasa nakon pankreatitisa indukovano ceruleinom [12,14,26].

Rezultati ovog istraživanja kod pacova sa PKS pokazali su povećanu ćelijsku gustinu i funkcionalnu aktivnost CCK-8-prodjujućih ćelija u duodenumu, što bi se moglo dovesti u vezu sa trofičnim efektom CCK na egzokrini pankreas. Najme, Nylander i saradnici [24] su pokazali da PKS kod pacova povećava trofični efekat CCK na pankreas, i da je za to odgovorna povećana koncentracija intestinalnih supstancija u cirkulaciji koja uslovljava povećanu osetljivost CCK-A receptora na acinusnim ćelijama za CCK mehanizmom koji je do sada nerazjašnjen. Poznato je da peptid koji oslobađa gastrin (GRP) ima takođe trofični efekat na pankreas, dovodeći do njegove hiperplazije sa povećanjem sadržaja DNK i ukupne težine organa, bilo direktnim dejstvom, bilo indirektno preko CCK [26], pa bi eventualna povećana sekrecija GRP takođe mogla biti odgovorna za hiperplaziju i hipertrofiju egzokrinog pankreasa. Zbog unekoliko oštećene funkcionalne aktivnosti hepatocita u PKS i poznate uloge jetre u metabolizmu i eliminaciji CCK,

"odložena" eliminacija CCK iz cirkulacije mogla bi biti odgovorna za veću aktivaciju CCK-A receptora. U eksperimentalnoj cirozi jetre kod pacova pokazano je da je povećana koncentracija CCK u plazmi odgovorna za hiperfunkciju i hiperplaziju pankreasa [25].

Radi ispitivanja fiziološkog značaja endogenog gastrina i CCK na regulaciju rasta intaktne jetre ili jetre u regeneraciji, Chen i saradnici [28] su ispitivali efekat izolovanog PKŠ kod pacova, kao i PKŠ udruženog sa hipergastrinijom i hiperholecistokinijom na težinu jetre i sadržaj DNK u ovom organu. Hipergastriniju su indukovali tretiranjem životinja omeprazolom (inhibitor protonske pumpe) ili fundektomijom, a hiperholecistokiniju pankreatobilijarnom diverzijom. Parcijalna hepatektomija je izvođena radi izazivanja regeneracije jetre. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da endogena hipergastrinija i hiperholecistokinija nemaju stimulacijski efekat na rast intaktne jetre i jetre u regeneraciji, a autori su ponovo istakli značaj portae cirkulacije u održavanju normalne strukture ovog organa [28].

Ispitujući ulogu endogene hipergastrinije u regeneraciji endokrinog pankreasa nakon parcijalne pankreatektomije Xu i saradnici [29] su pokazali da gastrin nema samo trofični efekat na endokrini pankreas, već da ispoljava sličan efekat i na njegov egzokrini deo. Iako se CCK-B receptori, koji se u podjednako meri vezuju za CCK i gastrin, ne eksprimiraju u pankreasu kod normalnog pacova, pokazano je da se eksprimiraju u oštećenom pankreasu i acinusnim i endokrinim ćelijama [14].

Zaključak

U eksperimentalnoj cirozi jetre kod pacova pokazano je da je povećana koncentracija CCK u plazmi odgovorna za hiperfunkciju i hiperplaziju pankreasa. Rezultati ovog rada su pokazali da se proliferacija i povećana funkcionalna aktivnost CCK-8 imunoreaktivnih ćelija kod životinja s PKŠ mogla dovesti u vezu sa povećanom ekspresijom CCK-A receptora u hiperplastičnim acinusnim ćelijama što može biti delimično odgovorno za trofični efekat na pankreas kod životinja sa PKŠ.

Literatura

1. Bismuth H, Benhamou JP, Lataste J. L'anastomose porto-cave experimentale chez le rat normal. *Presse Med* 1963;71: 859-61.
2. Assal JP, Levrat R, Stauffacher W, Renold AE. Metabolic consequences of portacaval shunting in the rat: effects on glucose tolerance and serum immunoreactive insulin response. *Metabolism* 1971;20:850-8.
3. Bani D, Cortesini C, Bani-Sacchi T. Effects of portacaval anastomosis on pancreatic islets of the rat. *Dig Dis Sci* 1994; 39:1048-54.
4. Milošević TS, Šikić B, Perišić-Savić M. Study of portacaval shunt effectiveness in rats. *Hepatogastroenterology* 1996; 43:737-43.
5. Radosavljević TS, Šikić B, Obradović-Stanojević D. Changes of serum urea values in rats with porta-caval shunt. *Acta Veterinaria* 1997;47:41-55.
6. Radosavljević T, Šikić B, Todorović V, Kandić LJ. Ammonia metabolism in rats with portacaval shunt. *Jugosl Physiol Pharmacol Acta* 1998;34:543-51.
7. Radosavljević T, Todorović V, Šikić B, Nikolić JA. Some metabolic and endocrine consequences in portacaval-shunted rats. *Jugosl Med Biochem* 2002;21:21-6.
8. Radosavljević T, Todorović V, Vučević D, Šikić B. Eksperimentalni model hronične insuficijencije jetre. *Med Istraž* 2004;28:35-42.
9. Radosavljević T, Todorović V, Boričić I, Šikić B. Liver atrophy following portacaval shunt in normal rats: a morphologic and ultrastructural study. *Acta Veterinaria* 2003;53:121-8.
10. Kruszynska YT, Ghatti MA, Bloom SR, McIntyre N. Insulin secretion and plasma levels of glucose-dependent insulinotropic peptide and glucagon-like peptide-1 (17-36 amide) after oral glucose in cirrhosis. *Hepatology* 1995;21:933-41.
11. Liddle RA. Cholecystokinin cells. *Annu Rev Physiol* 1997;59:221-42.
12. Liddle RA. Cholecystokinin. In: Walsh JH, Dockray GJ eds. *Gut peptides: biochemistry and physiology*. New York: Raven Press; 1994:175-216.
13. Shimizu K, Kobayashi M, Chey WY, Kato Y, Shiratori K, Ding Y, et al. Evidence for the existence of CCK-producing cells in the rat pancreatic islets. *Endocrinology* 1998;139:389-96.
14. Povoski SP, Zhou W, Longnecker DS, Jensen RT, Mantey SA, Bell RH. Stimulation of in vivo pancreatic growth in the rat is mediated specifically by way of cholecystokinin: a receptors. *Gastroenterology* 1994;107:1135-46.
15. Suman-Chauhan N, Meecham KG, Webdale L, Hunter JC, Pritchard MC, Woodruff GN, et al. The influence of guanylate nucleotide on agonist and antagonist affinity at guinea-pig CCK-B/gastrin receptors: binding studies using (3h)pd140376. *Regul Pept* 1996;65:37-43.
16. Clutter AC, Jiang R, McCann JP, Buchanan DS. Plasma cholecystokinin-8 in pigs with divergent genetic potential for feed intake and growth. *Dom Anim Endocrinol* 1998;15:9-21.
17. Wang J, Chakravarthy BR, Morley P, Whitfield JF, Durkin JP, Begin-Heick N. Glucose, potassium, and CCK-8 induce increases in membrane-associated pkc activity that correspond to increases in (Ca²⁺) in islet cells from neonatal rats. *Cell Signal* 1996;8:303-11.
18. Radosavljević T, Todorović V, Šikić B. Mehanizmi regulacije sekrecije insulina. *Med Pregl* 2004;57(5-6):249-53.
19. Simonsson E, Karlsson S, Ahren B. Involvement of phospholipase A2 and arachidonic acid in cholecystokinin-8-induced insulin secretion in rat islets. *Regul Pept* 1996;65:101-7.
20. Tarasova N, Greeley GH, Spannagel AW, Green GM, Gomez G, Reed JT, et al. Distribution and localization of a novel cholecystokinin-releasing factor in the rat gastrointestinal tract. *Endocrinology* 1997;138:5550-4.

21. Lee S, Fisher B. Portacaval shunt in the rat. *Surgery* 1961;50:668-72.
22. Todorović V, Koko V, Varagić J, Ilačković V, Vuzevski V, Milin J. Effects of chronic ethanol administration on the serotonin-producing cells in rat gastric antral and duodenal mucosa. *Histol Histopathol* 1993;8:285-96.
23. Hawkins PA, DeJoseph MR, Hawkins RA. Reversal of portacaval shunting normalizes brain energy consumption in most brain structures. *Am J Physiol* 1996;271:1015-20.
24. Baldwin GS. The role of gastrin and cholecystokinin in normal and neoplastic gastrointestinal growth. *J Gastroenterol Hepatol* 1995;10:215-32.
25. Nylander AG, Chen D, Rehfeld JF, Hakanson R. Portacaval shunt increases the trophic effect of cholecystokinin on the rat pancreas. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:145-8.

26. Bunnett N. Gastrin-releasing peptide. In: Walsh JH, Dockray GJ, eds. *Gut peptide: biochemistry and physiology*. New York: Raven Press, 1994:423-45.
27. Paloheimo JJ, Clemmensen O, Dalhoff K, Rehfeld JF. Plasma cholecystokinin and its precursors in hepatic cirrhosis. *J Hepatol* 1997;27:299-305.
28. Chen D, Hakanson R, Sundler F. Effects of omeprazole-evoked hypergastrinemia on ultrastructure of enterochromaffin-like cells in the stomach of portacaval-shunted rats. *Cell Tissue Res* 1993;272:71-7.
29. Xu G, Sumi S, Koike M, Tanigawa K, Nio Y, Tamura K. Role of endogenous hypergastrinemia in regenerating endocrine pancreas after partial pancreatectomy. *Dig Dis Sci* 1996;41:2433-9.

Summary

Introduction

End-to-side portacaval shunt (PCS) performed in rats is an appropriate experimental model of chronic liver insufficiency. Functional hepatic injury followed by numerous metabolic and endocrine disorders develops, as well. Due to impaired functional hepatic activity in PCS and to the well known role of the liver in CCK metabolism and elimination, delayed CCK blood-stream elimination may be responsible for increased CCK-A receptor activity. Therefore, we investigated immunohistochemical and morphometric features of duodenal CCK-cells in rats with PCS.

Material and methods

Male Wistar rats (180 - 250g body weight) were used in this experiment. The animals were divided into two groups: PCS-animals (experimental group (n=27) which underwent an operation) and C - unoperated animals [control group (n=11)].

Surgical technique

End-to-side portacaval anastomosis was created using the technique of Lee and Fisher, modified by Bismuth et al. Eight weeks after the operation, animals were sacrificed. Pancreatic and hepatic weights were measured and samples taken from appropriate segments of the small intestine were used for morphometric and immunohistochemical CCK-cells determination.

appropriate segments of the small intestine were used for morphometric and immunohistochemical CCK-cells determination.

Immunohistochemical technique

Peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique described by Stenberger was applied for detection of intestinal CCK-immunoreactive cells.

Results

Our results indicate that eight weeks after operation liver weight was reduced in animals with PCS compared to control animals ($p < 0.01$). To the contrary, in comparison with control animals, the pancreatic weight was increased ($p < 0.01$). In the exocrine pancreas of rats with PCS there were lipid droplets and hypertrophy of the acinus cells. The morphometric analysis of CCK-immunoreactive cells in different small intestine segments indicates that in the duodenum of animals with PCS there was a significant cell increase compared to control, unoperated animals.

Conclusion

In liver cirrhosis, plasma CCK-8 concentration increases. In PCS, performed in rats, as an experimental model of chronic liver insufficiency, proliferation of CCK-cells in the small intestine leads to pancreatic hypertrophy and hyperplasia.

Key words: Rats; Cholecystokinin; Intestine, Small; Immunohistochemistry; Portacaval Shunt; Surgical; Liver Cirrhosis; Experimental

Rad je primljen 17. I 2005.

Prihvaćen za štampu 25. V 2005.

BIBLID:0025-8105(2006)LIX-3-4:124-129.