

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr habil. Stanisław Grzycki

Zakład Biologii Wyższej Szkoły Nauczycielskiej w Bydgoszczy

Kierownik: doc. dr habil. Jerzy Łachowski

Irena PTASZYŃSKA-KRZYSZTOFOWICZ

Badania histochemiczne jelita cienkiego świnki morskiej po podaniu antrenylu

Гистохимические исследования тонкой кишки морской свинки после введения антренила

Histochemical Investigations of the Small Intestine in the Guinea-pig after Administration of Antrenyl

Badania histochemiczne jelita cienkiego zwierząt były tematem prac różnych autorów. Dominas (1960) zajmowała się występowaniem fosfatazy zasadowej w jelicie cienkim żaby podczas wchłaniania kwasów tłuszczowych i stwierdziła, że odgrywa ona istotną rolę we wchłanianiu tych kwasów. Przebieg procesów resorpcyjnych w jelicie cienkim myszy w stanach długotrwałego niedocukrzenia insulinowego z uwzględnieniem histochemicznych zmian aktywności i lokalizacji enzymów opracowali Zawistowski i Zielska (1960). Obserwowane przez nich zmiany przy stanach hipoglikemicznych dotyczą zmniejszenia aktywności fosfatazy zasadowej, lipazy i substancji lipidowych w komórkach nabłonka jelita. Brak jest natomiast różnic w lokalizacji i aktywności mukopolisacharydów. Sprawność wchłaniania jelitowego jest ściśle uzależniona od dowozu cukru gronowego do komórek nabłonka jelitowego. Staszyc i Królikowska (1967) badali wpływ wagotomii w odcinku brzuszny szczurów na niektóre reakcje enzymatyczne w komórkach nabłonka i gruczołach dwunastnicy. Na podstawie otrzymanych wyników autorzy stwierdzili, że przecięcie nerwów błędnych wpływa na procesy anaboliczne i kataboliczne zarówno komórek nabłonka jelitowego, jak i gruczołowego.

Nie znaleźliśmy publikacji dotyczących zmian histochemicznych w komórkach jelita ssaków po podaniu antrenylu. Antrenyl — Spasmophen działa porażająco na układ przywspółczulny i prowadzi do zablokowania zarówno pobudzających, jak i hamujących podniet p — sympatycznych oraz do osłabienia lub zahamowania procesów wydzielniczych gruczołów jelitowych (Dadlez, Kubikowski, 1970, Hano, 1965). Wydaje się więc celowe prześledzenie zmian histochemicznych, zachodzących w komórkach nabłonkowych i gruczołowych jelita cienkiego świnki morskiej po podaniu tego leku.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania doświadczalne przeprowadzono na młodych samicach świnek morskich hodowli własnej, ciężaru około 200 g. Zwierzęta w czasie doświadczenia przebywały w jednakowych warunkach i karmione standardową dietą. Świnkom grupy doświadczalnej podawano 1 mg antrenylu dootrzew-

nowo przez okres 3 dni — grupa pierwsza, 7 dni — grupa druga i 16 dni — grupa trzecia. Przy każdej grupie doświadczalnej była grupa kontrolna, w której zwierzętom podawano dootrzewnowo 1 ml soli fizjologicznej przez ten sam okres czasu co antrenyl w grupie doświadczalnej. Iniekcję płynu fizjologicznego oraz stosowanego leku dokonywano każdego dnia o tym samym czasie. Po 24 godzinach od ostatniej iniekcji zwierzęta dekapitowano w lekkiej narkozie eterowej i pobierano wycinki jelita cienkiego — odcinek czczy. Jedne z wycinków utrwalano w płynie Bakera do oznaczeń enzymatycznych i te krajano na mikrotomie mroźniowym na skrawki grubości 10 μ . Bezpośrednio przeprowadzano na nich reakcje enzymatyczne na fosfatazy kwaśną i zasadową. Jako substratu dla fosfatyz użyto 3 — glicerofosforanu sodu. Dla fosfatazy kwaśnej pH środowiska wynosiło 5,4, dla zasadowej pH wynosiło 9,4. Obydwie inkubacje przeprowadzono w ciągu 1 godz. w temp. 37°C. Drugie wycinki utrwalano w płynie Carnoya i zatapiano w parafinie. Na skrawkach grubości 6—8 μ przeprowadzano oznaczenia na kwasy rybonukleinowe (RNA) wg metody Bracheta (swoistość reakcji sprawdzano rybonukleazą krystaliczną) oraz na mukopolisacharydy obojętne wg reakcji PAS z odczynnikiem Schiffa. Reakcje kontrolne przeprowadzano diastazą i dimedonem.

BADANIA WŁASNE

1. Kwasy nukleinowe wg metody Bracheta

Grupa kontrolna. W cytoplazmie komórek nabłonka jelita cienkiego oraz w cytoplazmie komórek gruczołów Lieberkühna obserwowaliśmy silne odczyny pyroninochłonne wskazujące na obecność RNA. Potwierdziła to również wykonana przez nas kontrola z rybonukleazą. Ziarnistości pyroninochłonne rozmieszczone były we wszystkich komórkach nabłonka prócz komórek śluzowych — mukocytów. Jądra komórkowe zabarwiały się na zielono, co świadczyłoby o obecności DNA. Chromatyna jądrowa skupiona była w pobliżu błony jądrowej (ryc. 1.).

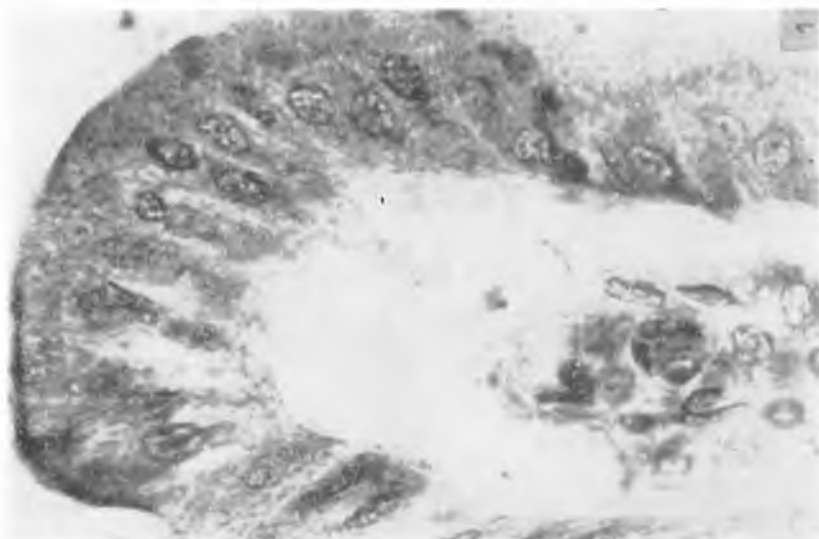
Grupa doświadczalna I. (Antrenyl 3 dni po 1 mg). Zarówno odczyny RNA w cytoplazmie, jak i odczyny DNA w jądrze nie ulegają wyraźnym zmianom.

Grupa doświadczalna II. (Antrenyl 7 dni po 1 mg). Zaobserwowaliśmy tylko nieznaczne obniżenie odczynu na RNA, o czym świadczy słaba pyroninochłonność cytoplazmy w komórkach nabłonkowych i gruczołów jelitowych. Zmian w odczynach DNA w porównaniu z preparatami nie zauważyliśmy (ryc. 2).

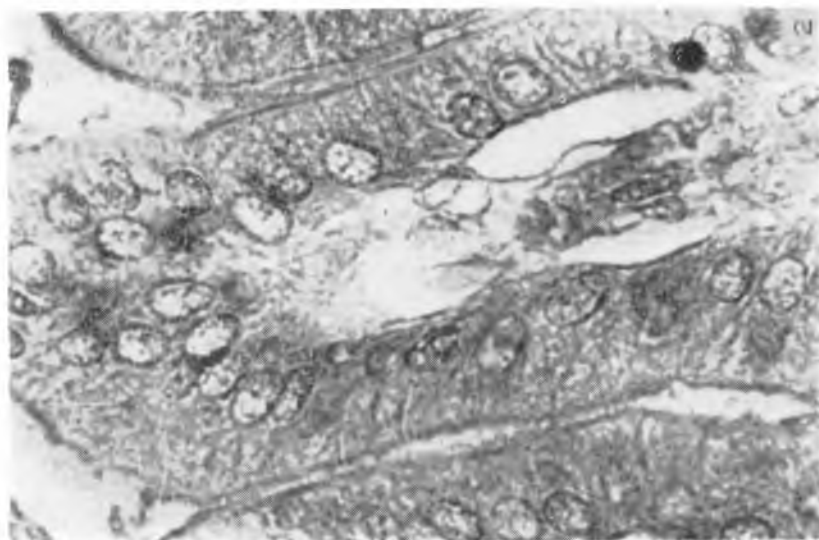
Grupa doświadczalna III. (Antrenyl 16 dni po 1 mg). Nastąpiło wyraźne osłabienie odczynu na RNA w obrębie cytoplazmy. Jądra komórkowe były również mniej intensywnie zabarwione (ryc. 3).

2. Mukopolisacharydy obojętne — PAS

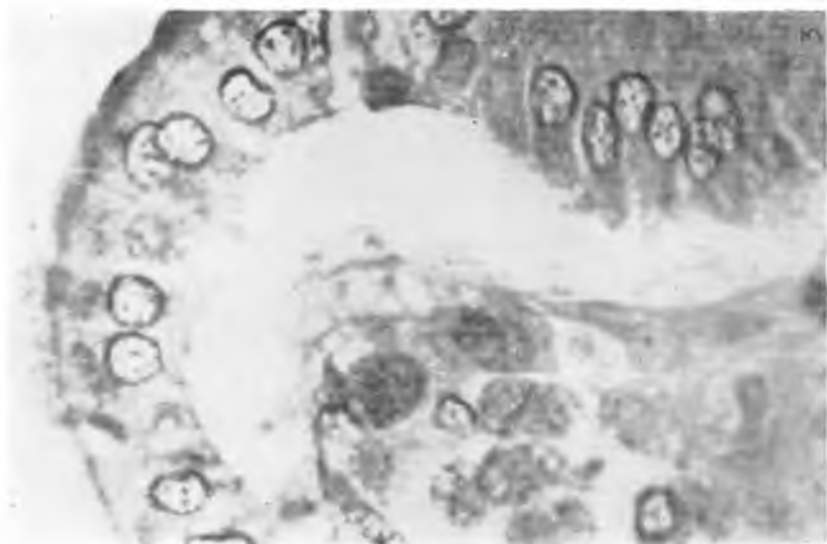
Grupa kontrolna. Najsilniejszą reakcję PAS — pozytywną wykazywał rąbek oskórkowy enterocytów, komórki śluzowe i komórki Panetha w dolnych odcinkach gruczołów jelitowych. Również silną reakcję PAS obserwowano w zrębie łącznotkankowym kosmków (ryc. 4). Ziarna PAS — pozytywne występujące w komórkach śluzowych ulegały zablokowaniu dimedonem co świadczy, że nie zawierają glikogenu. Natomiast w oskórku ziarna nie blokują się, co wskazuje na występowanie glikogenu.



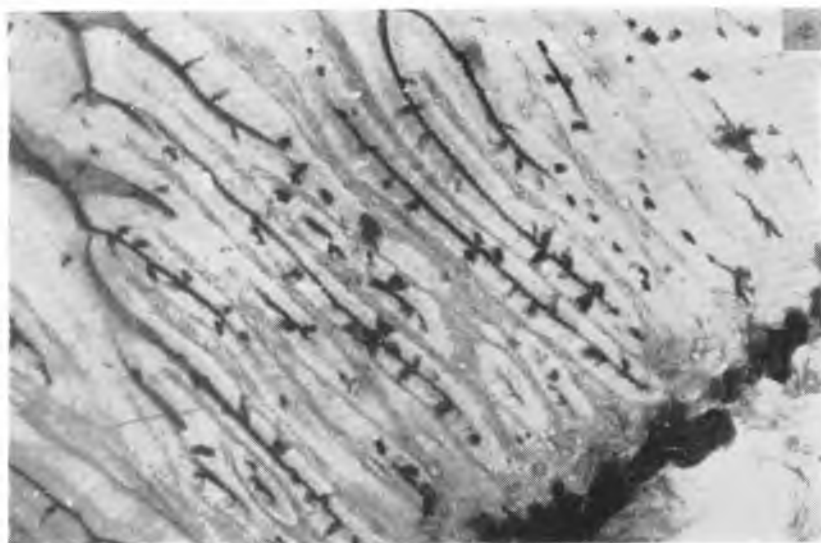
Ryc. 1



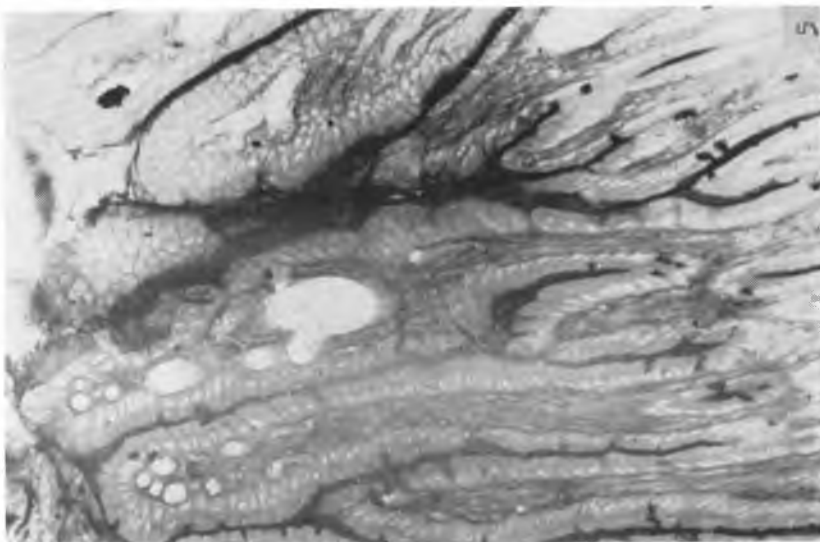
Ryc. 2



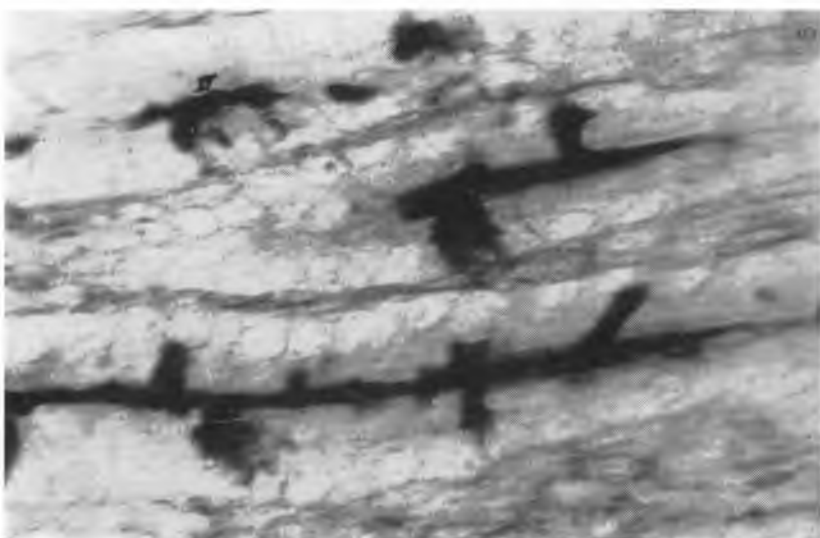
Ryc. 3



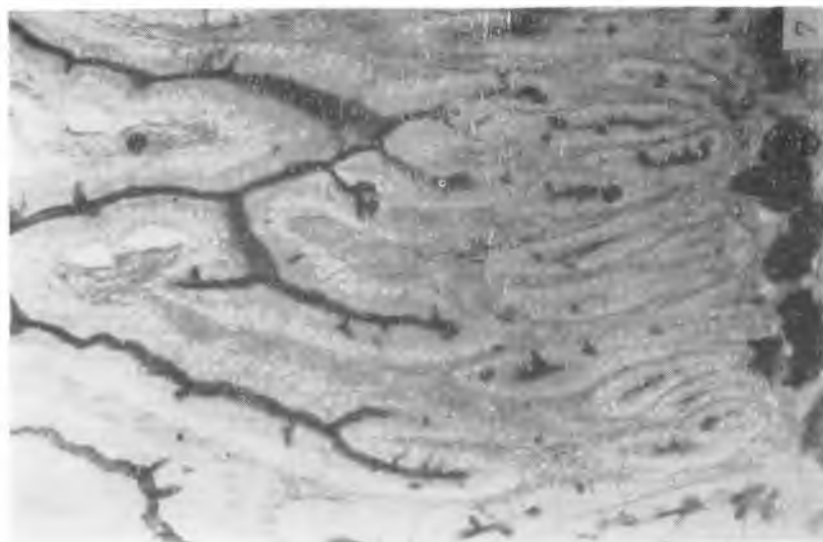
Ryc. 4



Ryc. 5



Ryc. 6



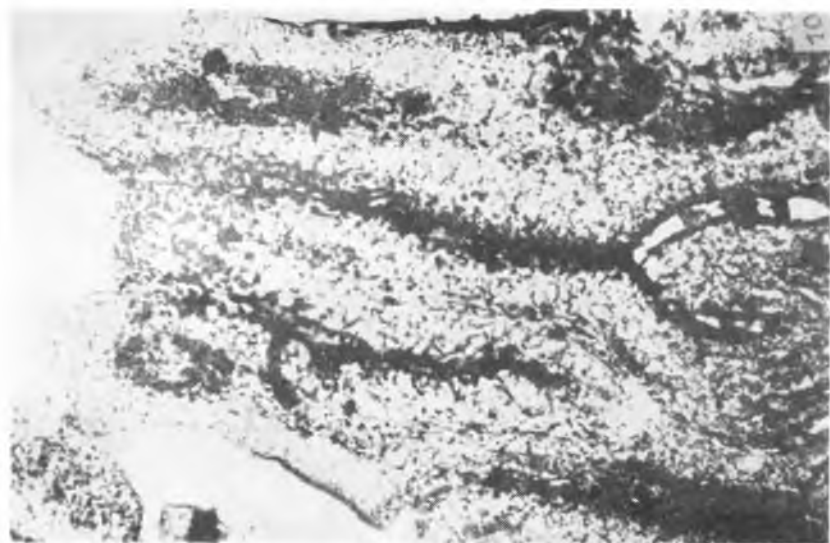
Ryc. 7



Ryc. 8



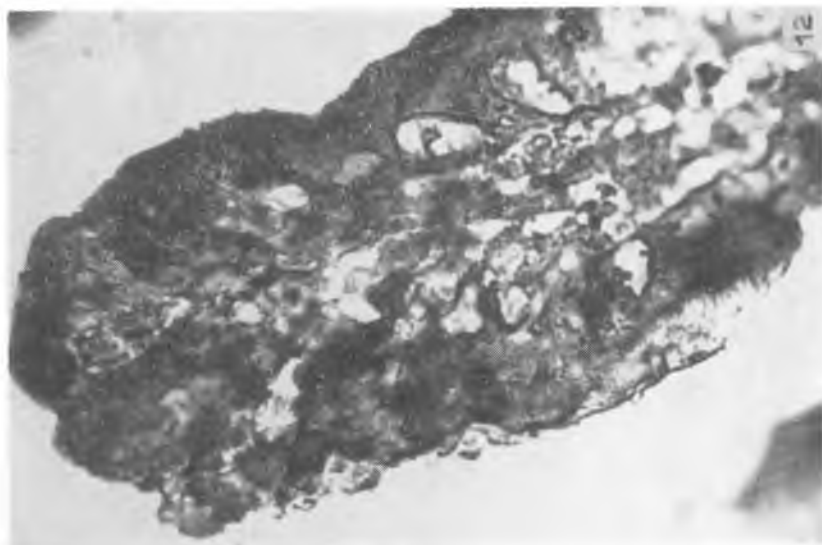
Ryc. 9



Ryc. 10



Ryc. 11



Ryc. 12

Grupa doświadczalna I. (Antrenyl 3 dni po 1 mg). Śluz daje tu również reakcję PAS — pozytywną w obrębie nabłonka i błony śluzowej. Reakcja ta była intensywniejsza w porównaniu z grupami kontrolnymi (ryc. 5, 6).

W grupach doświadczalnych II i III, gdzie czas podawania antrenylu wydłużał się do 7 i 16 dni, intensywność reakcji wzmagala się głównie w strefie ponadjądrowej enterocytów i w komórkach śluzowych (ryc. 7). Ziarna śluzu miały zmienne położenie, co świadczyło o różnych fazach czynnościowych komórki. Intensywne reakcje PAS — pozytywne występowały, podobnie jak w materiale kontrolnym, w komórkach Panetha na dnie gruczołów. Wybarwienie substancji PAS pozytywnej nie zmieniało się pod wpływem diastazy i nie ulegało zablokowaniu dimedonem.

3. Fosfataza kwaśna

Grupa kontrolna. Wyraźny odczyn enzymatyczny w obrębie enterocytów w postaci drobnych ziarenek widoczny był w szczytowych strefach komórek. Natomiast aktywność enzymatyczna słabła lub nie obserwowano jej wcale w mukocytach kosmków jelitowych (ryc. 8).

Grupa doświadczalna I miała obraz odczynów enzymatycznych na fosfatazę kwaśną taki sam, jak grupa kontrolna.

Grupy doświadczalne II i III wykazywały nieznaczny spadek reakcji na fosfatazę kwaśną w porównaniu z przypadkami kontrolnymi. Ziarnistości świadczące o aktywności fosfatazy kwaśnej lokalizowały się jak w materiale kontrolnym. Podobnie jak w materiale kontrolnym, zauważyliśmy brak lub słabe reakcje enzymatyczne w obrębie komórek śluzowych (ryc. 9, 10).

4. Fosfataza zasadowa

Grupa kontrolna. Odczyn na fosfatazę zasadową umiejscawiał się w rąbku oskórkowym, szczytowej części enterocytów i gruczołach Lieberkühna, które dają słabą reakcję enzymatyczną w stosunku do komórek nabłonkowych kosmków jelita. Reakcję enzymatyczną obserwowaliśmy również w błonie śluzowej i podśluzowej kosmków (ryc. 11.).

Grupa doświadczalna I nie wykazywała istotnych zmian w porównaniu z preparatami kontrolnymi. Wyraźna reakcja utrzymywała się w obrębie rąbka oskórkowego.

W grupach doświadczalnych II i III zauważyliśmy wzrost odczynu na aktywność fosfatazy zasadowej, która zlokalizowała się nie tylko w rąbku oskórkowym, ale również w całej cytoplazmie enterocytów, a głównie w ich szczytowej części (ryc. 12).

WYNIKI BADAŃ I WNIOSKI

Czynność wydzielnicza jelit pozostaje pod wpływem układu nerwowego, głównie nerwów błędnych. Zakończenia tych nerwów regulują bowiem wydzielanie komórek gruczołowych jelita cienkiego (Bloom, 1967). W związku z tym, iż użyty przez nas

w doświadczeniu lek poraża układ nerwowy prześledziliśmy zmiany histochemiczne, jakie wystąpiły pod jego wpływem w komórkach nabłonka i gruczołów jelita cienkiego świnki morskiej.

Po 7, a zwłaszcza 16 dniach podawania antrenylu zaobserwowaliśmy osłabienie intensywności reakcji na kwasy nukleinowe zarówno w obrębie cytoplazmy, jak i jądra komórkowego. Stwierdziliśmy, że podawanie antrenylu wpływa na zmiany odczynów tych kwasów, przy czym zmiany są tym wyraźniejsze, im wydłuża się okres podawania leku. Podobne zmiany zauważa Stawarska (1970) w komórkach trzustki po działaniu antrenylu, a Staszyc i Królikowska (1967) po wagotomii.

Rozmieszczenie mukopolisacharydów jest zgodne z tym co widzieli Staszyc i Królikowska (1967) po wagotomii. Potwierdzamy również za Stawarską (1970), że w obserwowanych przez nas przypadkach intensywność reakcji PAS wzrastała się w miarę trwania doświadczenia. Zauważone przez nas zmiany w obrębie mukopolisacharydów świadczyć mogą o fazie czynnościowej, w jakiej znajduje się komórka. Sądzymy podobnie jak Kanwar (1962), że każdy mukocyt stanowi jednostkę autonomiczną, a wydzielanie śluzu jest procesem okresowym, nie ciągłym. Uważamy, że zmiany w zachowaniu się mukopolisacharydów są spowodowane działaniem antrenylu, pod wpływem którego dochodzi do zahamowania bodźców nerwowych. Wg Dominas (1960) zmiany aktywności fosfatazy zasadowej świadczą, iż jest ona czułym wskaźnikiem stanów fizjologicznych. Nasze obserwacje wskazują, że zmienne odczyny występowały głównie w rąbku oskórkowym. To pozwala przypuszczać, że wchłanianie, które odbywa się przez rąbek zachodzi przy udziale fosfatazy zasadowej i że zostało ono zaburzone na skutek działania leku.

Fosfataza zasadowa w rąbku i szczytowej części komórek nabłonkowych może być pochodzenia pinocytarnego i uzależniona jest od katabolizmu komórek absorbujących (Hugon i Borgers — 1966, 1968). Zauważyliśmy zmniejszenie reakcji enzymatycznych na fosfatazę kwaśną w enterocytach oraz w komórkach gruczołowych. Uważamy, że długie podawanie leku powoduje zmiany w procesach wydzielniczych, z którymi związana jest także obecność fosfatazy kwaśnej.

Stosowane przez nas reakcje histochemiczne na kwasy nukleinowe, mukopolisacharydy i fosfatazy wskazują na upośledzoną syntezę białek enzymatycznych w komórkach i gruczołach jelita cienkiego. Na tej podstawie sądzymy, że podawanie antrenylu, zwłaszcza przez długi okres czasu, poraża nerw błędny i wpływa hamująco na procesy resorpcyjne i wydzielnicze komórek nabłonkowych i gruczołowych jelita cienkiego.

PIŚMIENNICTWO

1. Bloom W., Fawcett W.: *Histologia*, PZWL. Warszawa 1967.
2. Dadlez I., Kubikowski P.: *Farmakologia i toksykologia leków*, PZWL. Warszawa 1970.
3. Dominas H.: *Folia Morph.* **11**, 241—243, 1960.
4. Hano I.: *Farmakologia i farmakodynamika*. PZWL. Warszawa. 1965.

5. Hugon I., Borgers M. : *Cytochem.* **10**, 629—640, 1966.
6. Hugon I., Borgers M. : *Histochemie* **12**, 42—66, 1968.
7. Kanwar K. C. : *Cytologia* **27**, 233—247, 1962.
8. Staszyc J., Królikowska-Prasał I. : *Annales Univ. M. Curie Skłodowska. Lublin, Sec. D.* **22**, 257—264, 1967.
9. Stawarska H. : Praca magisterska 1970 (nie publikowana).
10. Zawistowski S., Zielska T. : *Folia Morphol.* **11**, 93—99, 1960.

Otrzymano 15.VII.1971.

Objaśnienia do rycin

Ryc. 1. Jelito cienkie świnki morskiej. Grupa kontrolna. Kwasy nukleinowe wg met. Bracheta Pow. ca 480 ×.

Ryc. 2. Jelito świnki morskiej w 7 dni po podawaniu antrenylu. Odczyn DNA w jądrach komórek nabłonkowych. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 3. Jelito świnki morskiej w 16 dni po podawaniu antrenylu. Odczyn na RNA w cytoplazmie komórek nabłonkowych. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 4. Jelito świnki morskiej. Grupa kontrolna. Odczyn na mukopolisacharydy obojętne w rąbku oskórkowym enterocytów, w komórkach śluzowych i Panetha. Pow. ca 140 ×.

Ryc. 5. Jelito świnki morskiej w 3 dni po podawaniu antrenylu. Intensywna reakcja PAS — pozytywna w nabłonku i błonie śluzowej kosmków. Pow. ca 240 ×.

Ryc. 6. Jelito świnki morskiej w 3 dni po podawaniu antrenylu. Wyraźne odczyny PAS dodatnie w komórkach śluzowych. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 7. Jelito świnki morskiej w 7 dni po podawaniu antrenylu. Wzmoczona reakcja PAS — pozytywna w strefie ponadjądrowej enterocytów i w komórkach śluzowych. Pow. ca 250 ×.

Ryc. 8. Jelito świnki morskiej. Grupa kontrolna. Odczyn na fosfatazę kwaśną. Pow. ca 140 ×.

Ryc. 9. Jelito świnki morskiej w 7 dni po podawaniu antrenylu. Nieznaczny spadek aktywności enzymatycznej na fosfatazę kwaśną. Pow. ca 240 ×.

Ryc. 10. Jelito świnki morskiej w 16 dni po podawaniu antrenylu. Słabe reakcje enzymatyczne na fosfatazę kwaśną w komórkach śluzowych kosmków. Pow. ca 140 ×.

Ryc. 11. Jelito świnki morskiej, Grupa kontrolna. Odczyn na fosfatazę zasadową. Pow. ca 140 ×

Ryc. 12. Jelito świnki morskiej w 7 dni po podawaniu antrenylu. Wzrost odczynu na aktywność fosfatazy zasadowej. Pow. ca 240 ×.

РЕЗЮМЕ

Наблюдали гистохимические изменения, происходящие в эпителиальных и железистых клетках кишки морской свинки после введения антренила. Гистохимические реакции на нуклеиновые кислоты, мукополисахариды и фосфатазы указывают на ослабленный синтез энзиматических белков в клетках и железах тонкой кишки. На этом основании констатировали, что введение антренила поражает блуждающий нерв и тормозит резорбционные и секреторные процессы эпителиальных и железистых клеток тонкой кишки.

SUMMARY

Histochemical changes in the epithelial and glandular cells of the small intestine of the guinea-pig were examined after the administration of antrenyl. Histochemical reactions to nucleic acids, mucopolysaccharides and phosphatases point to weak synthesis of enzymatic proteins in the cells and glands of the small intestine. On this basis, it was found that the administration of antrenyl paralyses the vagus nerve and inhibits resorption and secretory processes in the epithelial and glandular cells of the small intestine.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Small intestine of the guinea-pig. Control group. Nucleic acids. acc. to Brachet's method. Magn. ca 480 ×.

Fig. 2. Intestine of the guinea-pig, 7 days after antrenyl administration. DNA reaction in the nuclei of the epithelial cells. Magn. ca 480 ×.

Fig. 3. Intestine of the guinea-pig, 16 days after antrenyl administration. RNA reaction in the cytoplasm of the epithelial cells. Magn. ca 480 ×.

Fig. 4. Intestine of the guinea-pig. Control group. Reaction to neutral mucopolysaccharides in the cuticular border of the epithelial cells, in the mucous cells and Paneth's cells. Magn. ca 140 ×.

Fig. 5. Intestine of the guinea-pig, 3 days after antrenyl administration. Intensive PAS reaction — positive in the epithelium and mucosa of the villi. Magn. ca 240 ×.

Fig. 6. Intestine of the guinea-pig, 3 days after antrenyl administration. Distinct PAS reactions — positive in the mucous cells. Magn. ca 480 ×.

Fig. 7. Intestine of the guinea-pig, 7 days after antrenyl administration. Intensive PAS reaction — positive in the supranuclear zone of enterocytes and in the mucous cells. Magn. ca 250 ×.

Fig. 8. Intestine of the guinea-pig. Control group. Reaction to acid phosphatase. Magn. ca 140 ×.

Fig. 9. Intestine of the guinea-pig, 7 days after antrenyl administration. A slight decrease in the enzymatic activity of acid phosphatase. Magn. ca 240 ×.

Fig. 10. Intestine of the guinea-pig, 16 days after antrenyl administration. Weak enzymatic reactions to acid phosphatase in the mucous cells of the villi. Magn. ca 140 ×.

Fig. 11. Intestine of the guinea-pig. Control group. Reaction to alkaline phosphatase. Magn. ca 140 ×.

Fig. 12. Intestine of the guinea-pig, 7 days after antrenyl administration. Increased reaction to alkaline phosphatase. Magn. ca 240 ×.