

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Grażyna RZESZOWSKA
i Barbara CISZEWSKA-POPIOŁEK

Histochemiczne badania nad aktywnością β -glikuronidazy w wątrobie i macicy w przebiegu ciąży u świnek morskich

Recherches histochimiques sur l'activité de la β -glycuronidase dans le foie et dans l'utérus pendant la grossesse chez les cobayes

W obrębie struktur komórkowych duże ilości β -glikuronidazy występują w lizosomach. Wykazywanie tego enzymu w tkankach uległo zmianie w związku z wprowadzeniem barwników azowych. Dotychczasowe wyniki otrzymane wg metody Fishmana i Bakera (3, 5) były niepewne (4, 14). Ważny jest dobór utrwalacza. Hayashi i wsp. (6) polecają obojętną 4% formalinę także z dodatkiem CaCl_2 , a Pearse i Janigan (15) — sole metali ciężkich, szczególnie kadmu. β -glikuronidaza bierze aktywny udział w przemianach komórek prawidłowych, nowotworowych (13), w procesach regeneracji (17), jak również reaguje na przestrojenia hormonalne w ustroju.

W naszej pracy przebadano aktywność β -glikuronidazy w wątrobie i macicy ciężarnych świnek morskich. Zarówno wątroba, jak i macica są narządami związanymi z przemianami hormonalnymi.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzono na samicach świnek morskich rasy holenderskiej przebywających w stałych warunkach hodowlanych. Zwierzęta podzielono na trzy grupy: Pierwszą stanowiły samice kontrolne, które jeszcze nie wydawały potomstwa, a znajdowały się w okresie rujowym, co stwierdzono przy pomocy rozmazów pochwowych. W drugiej grupie były świnki ciężarne, które rodziły jeden raz lub dwukrotnie, a znajdowały się w około 20 dniu ciąży. Do trzeciej grupy natomiast zaliczano samice, będące w ok. 60 dniu ciąży.

Materiał pobierano po dekapitacji zawsze w stałych porach dnia między godz. 8—10. Wycinki macicy sporządzano z rogów, a wątroby ze środkowych okolic płata.

W wypadku świnek ciężarnych pochodziły one z tych okolic macicy, które nie były w bezpośrednim kontakcie z jajem płodowym. Skrawki grubości 8—10 mikronów krojono na mikrotomie zamrażającym. Obecność β -glikuronidazy wykazywano wg metody Seligmana, Tsou, Rutenburga i Cohena (10). Odczyn na β -glikuronidazę manifestował się w postaci drobnych, amarantowych ziarenek rozrzuconych w cytoplazmie.

BADANIA WŁASNE

Pierwsza grupa badana stanowiła samice kontrolne.

Macica: W komórkach nabłonka macicy obserwowano wyraźny ziarnisty odczyn, świadczący o obecności β -glikuronidazy. Ziarenka występowały pojedynczo lub w większych skupieniach (ryc. 1). Amarantowa barwa ziarenek nasuwała przypuszczenie o znacznej aktywności enzymu w nabłonku.

Wysoką aktywność β -glikuronidazy stwierdzono w gruczołach macicy (ryc. 2). Bardzo liczne ziarenka, rozrzucone w komórkach gruczolowych skupiały się przeważnie w większe konglomeraty. Kolor ziarenek, podobnie jak w nabłonku, był zdecydowanie amarantowy. W błonie śluzowej właściwej obserwowano rozmieszczone równomiernie drobne ziarenka. Zabarwienie ziarenek różniło się od poprzednio opisywanych, były bledsze, co może przemawiać za niższą aktywnością enzymu. Mięśniówka macicy zawierała liczne, drobne, amarantowe ziarenka, które raczej nie tworzyły większych zespołów (ryc. 3). W miejscach gdzie tkanka łączna izolowała poszczególne wiązki mięśni spostrzegano mniejszą liczbę bladeamarantowych ziarenek. W naczyniach krwionośnych obserwowano pojedyncze ziarna w śródbłonku.

Wątroba: W obrazie mikroskopowym wątroby świnek morskich obserwowano słabo zaznaczoną budowę zrazikową. Odczyn barwny na β -glikuronidazę występował w postaci drobniotkich ziarenek, które raczej nie skupiały się w większe zespoły (ryc. 4). Bardzo wnikliwa analiza skrawków pozwalała dostrzec w bliskim sąsiedztwie naczyń krwionośnych i na granicy kanalików żółciowych występowanie dużych, ciemnoamarantowych ziarnistości. Tkankę łączną międzyzrazikową cechowała obecność nielicznych, pojedynczych ziarenek. Ściany tętnic w porównaniu z żyłami były bogatsze w ziarnistości w odcieniu amarantowym. W obrębie tzw. triady wątrobowej znaczną aktywnością enzymatyczną wyróżniał się przewód żółciowy. Ściana przewodu zawierała różnej wielkości ziarenka gęsto ułożone obok siebie.

Druga badana grupa zwierząt obejmowała samice, znajdujące się ok. 20 dnia ciąży.

Macica: Błona śluzowa macicy (doczesna) układała się w fałdy, a komórki nabłonka miejscami ulegały spłaszczeniu, granice między nimi

zacierają się — wykazywały cechy zwyrodnienia. W wielu komórkach nabłonka obserwowano liczne, grube ziarna, gęsto ułożone obok siebie, mające skłonności do skupiania się. Natomiast w innych miejscach w nabłonku ziarenek było mniej i nie tworzyły skupień (ryc. 5). Wszystkie jednak opisywane ziarenka miały zabarwienie amarantowe. W błonie śluzowej właściwej spostrzegano dość liczne większe i mniejsze ziarnistości, również amarantowe. W przerosniętych gruczołach widoczne były bardzo duże ilości grubych ziaren, tworzących skupienia, intensywnie zabarwionych. W nabłonku gruczołowym zwracał uwagę fakt, że wierzchołkowe części komórek nie wykazywały dodatniego odczynu na β -glikuronidazę. W ścianach licznych naczyń krwionośnych obserwowano się pojedyncze, grube ziarna. W mięśniówce układ i ilość ziarnistości przypominał zupełnie obraz opisywany w grupie kontrolnej.

Wątroba: W wątrobie samic będących w ok. 20 dniu ciąży można było zauważyć liczne, drobne, amarantowe ziarenka gęsto ułożone obok siebie (ryc. 6). Spostrzegano się również skupienia ziarnistości wokół naczyń krwionośnych i kanalików żółciowych. Odczyn barwny w obrębie triad wątrobowych zachowywał się podobnie, jak w grupie poprzedniej. Zasadniczo więc należy przyjąć, że obraz wątroby kontrolnej i z wymienionego okresu ciąży nie różnił się od siebie w zakresie opisywanej przez nas reakcji histochemicznej dla β -glikuronidazy.

Trzecia grupa badana obejmowała świnki znajdujące się w ok. 60 dniu ciąży.

Macica: W macicy tego okresu występowały zasadnicze zmiany związane m. in. z rozciąganiem jej przez rosnące płody. Nabłonek zanikł zupełnie, gruczoły stały się niewyraźne, szczelinowate, znacznie oddalone od siebie. Zarówno w doczesnej, jak w gruczołach i mięśniówce obserwowano gęsto rozrzucone różnej wielkości ziarenka. Wśród drobnych bladoamarantowych wyróżniały się duże, ciemno zabarwione. Odczyn na β -glikuronidazę w tej grupie zwierząt sprawiał wrażenie mniej aktywnego w porównaniu z poprzednio opisywanymi.

Wątroba: W wątrobie świnek z późnego okresu ciąży nie uchwyciono różnic w reakcji histochemicznej na β -glikuronidazę w porównaniu z wątrobą grupy kontrolnej i grupy obejmującej świnki będące we wczesnym okresie ciąży (20 dzień). Zarówno lokalizacja, jak i nasilenie odczynu barwnego w tych grupach było bardzo do siebie podobne.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

W przedstawionej przez nas pracy jako eksperymentu wykorzystaliśmy ciążę, która wywołuje głębokie przemiany biologiczne w ustroju, dotyczące każdego narządu. Od chwili zagnieżdżenia się jaja w błonie

śluzowej macicy, ulegają zasadniczej zmianie stosunki hormonalne. Następuje zahamowanie dojrzewania pęcherzyków Graafa, rozwój ciała żółtego, a w następnym okresie przejście czynności hormonalnej przez łożysko. Zagadnienia dotyczące związku między aktywnością β -glikuronidazy a różnorodnymi stanami hormonalnymi w ustroju było przedmiotem licznych prac. *Knobil E.* (8), badając wpływ usunięcia przysadki mózgowej, podawania kortisonu, benzoesanu oestradiolu na zachowanie się β -glikuronidazy w nadnerczach, stwierdził, że jedynie usunięcie przysadki mózgowej spowodowało znaczny wzrost ilości β -glikuronidazy. Natomiast pozostałe czynniki nie wywołały zmian w aktywności enzymu. *Riottton i Fishman* (16) podawali propionian testosteronu myszkom i zauważyli wyraźne podniesienie poziomu β -glikuronidazy w nerkach. Reakcja na β -glikuronidazę była dodatnia zarówno w komórkach kanalików, jak i w świetle. Autorzy próbują wysuwać wniosek, że β -glikuronidaza w nerkach pobudzana przez androgeny może być wydalana z moczem. *Leonard i Knobil* (11) po usunięciu jajników u szczurów stwierdzili spadek aktywności β -glikuronidazy w drogach rodnych. Jednak podawanie w iniekcjach benzoesanu oestradiolu powodowało już po 48 godz. zwiększenie się ilości tego enzymu. Przedłużone podawanie estrogenów u samic szczurów pozbawionych jajników, utrzymywało stężenie β -glikuronidazy takie, jakie obserwuje się u zwierząt nie kastrowanych. *Knobil E.* (9) i *Fishman* (1) stoją na stanowisku, że zwiększenie poziomu estrogenów w ustroju prowadzi do wzrostu aktywności β -glikuronidazy w drogach rodnych. *Fishman* i *Farmelant* (2) uzależniają reakcję β -glikuronidazy w tkankach na ten sam bodziec od całego szeregu czynników, m. in. od szczepu zwierzęcia, od płci i od rodzaju tkanki.

Na podstawie naszych obserwacji, dotyczących macicy nie można stwierdzić, czy we wczesnym okresie ciąży zwiększyła się ilość β -glikuronidazy. Można natomiast przypuszczać, że zmieniło się rozłożenie aktywności tego enzymu w związku ze zmianami morfologicznymi w nabłonku. Obok miejsc, gdzie spostrzegano bardzo liczne, grube ziarna, mające tendencję do skupiania się, o zdecydowanie amarantowym zabarwieniu, były miejsca z mniej nasiloną reakcją barwną. Odczyn dla β -glikuronidazy w tkance podnabłonkowej, gruczołach, mięśniówce u świnek z tego okresu ciąży nie różnił się od obserwowanego w grupie świnek kontrolnych. Obraz taki może przemawiać za różną intensywnością reakcji biochemicznych, w których bierze aktywny udział β -glikuronidaza, szczególnie w ulegającym przemianom nabłonku. W oparciu o nasze wyniki na kilka dni przed porodem (60 dzień ciąży) zmienił się odczyn barwny na β -glikuronidazę. Zmiany morfologiczne w macicy być może spowodowały ujednoczenie obrazu reakcji enzymatycznej. W doczesnej,

gruczołach i mięśniówce macicy widziało się liczne ziarenka przeważnie bladeamarantowe. Nie widać było różnic w aktywności enzymu w poszczególnych strukturach ściany macicy. Opisywane przez nas obrazy pozwoliły przypuszczać, że aktywność enzymu zmalała. Jednak mechanizm, jaki zachodzi między aktywnością enzymu, a przemianami w zakresie hormonów, nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony.

Drugim narządem, w którym obserwowaliśmy β -glikuronidazę była wątroba. Komórki wątrobowe obfitują w lizosomy zawierające znaczne ilości β -glikuronidazy oprócz całego szeregu enzymów. Z wątroby ssaków wyizolowano układy enzymatyczne, biorące udział zarówno w przemianie hormonów sterydowych, jak i w detoksykacji innych substancji szkodliwych dla ustroju. Te zespoły enzymów odznaczają się indywidualnością gatunkową, np. u psa, świnki morskiej i królika są bardzo podobne, natomiast różnią się u szczura. Wysocki (18) podaje, że przy poważnym uszkodzeniu komórek wątrobowych spotykamy się z podwyższeniem się poziomu β -glikuronidazy w surowicy krwi w związku z pękaniem lizosomów. Obserwacje te mają nawet pewne znaczenie diagnostyczne. Podobnie Mc Donald i Odell (12) zauważyli zwiększenie się ilości β -glikuronidazy w surowicy krwi w okresie ciąży, a zwłaszcza w zatruciu ciążowym, co można również tłumaczyć uwalnianiem się β -glikuronidazy z lizosomów.

Nasze badania wykazały wyraźny odczyn barwny na β -glikuronidazę w komórkach wątroby zarówno u zwierząt kontrolnych, jak i ciężarnych. Przy pomocy stosowanej przez nas reakcji barwnej nie zauważyliśmy występowania różnej aktywności enzymatycznej w poszczególnych badanych grupach. Obfite, amarantowe ziarenka, rozrzucone w cytoplazmie często skupiały się w okolicy naczyń krwionośnych i na granicy kanalików żółciowych, świadcząc o wysokiej aktywności enzymu. Podobny obraz w prawidłowej wątrobie szczura obserwowali Hayashi, Nakajima i Fishman (7). Wymienieni wyżej autorzy, barwiąc również fosfatazę kwaśną, zauważyli, że układa się ona podobnie do β -glikuronidazy w obrębie miąższu wątroby. Czynność enzymatyczną wątroby trudno jest powiązać z okolicami anatomicznymi zrazika, mimo że pewne enzymy mają charakterystyczną dla siebie lokalizację, np. fosfataza zasadowa występuje przeważnie na obwodzie zrazików, a lipazy centralnie. Oceniając jednak procesy enzymatyczne w wątrobie należy przyjąć, że aktywność i tworzenie się fermentów jest bardzo plastyczne, zależne od sytuacji, w jakiej znajduje się badany ustrój.

Nasze obserwacje doprowadziły do wyciągnięcia następujących wniosków:

1. Wątroba cechuje się wysoką aktywnością β -glikuronidazy. Reakcja

barwna nie wykazywała różnic w nasileniu aktywności enzymu w wątrobie świnek kontrolnych i ciężarnych.

2. W macicy dużą aktywność enzymatyczną stwierdzono w nabłonku i gruczołach, małą zaś w błonie śluzowej właściwej i w mięśniówce.

3. We wczesnym okresie ciąży (20 dzień) obserwowano różnice w nasileniu reakcji barwnej w poszczególnych odcinkach nabłonka. W gruczołach, w błonie śluzowej właściwej, mięśniówce odczyn barwny pozostał taki sam, jak w grupie kontrolnej.

4. W późnym okresie ciąży (60 dzień) nastąpiło ujednoczenie z jednoczesnym osłabieniem aktywności β -glikuronidazy we wszystkich strukturach ściany macicy.

PISMIENICTWO

1. Fishman W. H.: J. Biol. Chem. **169**, 7—15, 1947.
2. Fishman W. H., Farmelant M. H.: Endocrinology, **52**, 536—545, 1953.
3. Fishmann W. H., Goldman S. S., Green S.: J. Histochem. Cytochem. **12**, 239—251, 1964.
4. Fishman W. H., Green S., Hayashi M.: (Abstract and discussion) J. Histochem. Cytochem. **12**, 27—28, 1964.
5. Fishman W. H., Nakajima Y., Anstiss C., Green S.: J. Histochem. Cytochem. **12**, 298—305, 1964.
6. Hayashi M., Fishman W. H.: J. Histochem. Cytochem. **10**, 107—108, 1962.
7. Hayashi M., Nakajima Y., Fishman W. H.: J. Histochem. Cytochem. **12**, 3—4, 1964.
8. Knobil E.: Proc. Soc. exp. Biol. **83**, 769—771, 1953.
9. Knobil E.: Endocrinology, **50**, 16—28, 1952.
10. Krygier A., Godlewski H.: Skrypt metod histochemicznych, Pol. Tow. Histochem. Cytochem., Warszawa 1963.
11. Leonard S. L., Knobil E.: Endocrinology, **47**, 331—337, 1950.
12. McDonald D. F., Odell L. D.: J. Clin. Endocrinol. **7**, 535—542, 1947.
13. Monis B., Rutenburg A. M.: Am. J. Pathol. **33**, 604, 1957.
14. Pearse A. G. E.: Histochemistry Theoretical and Applied, Churchill, Londyn 1960.
15. Pearse A. G. E., Janigan D.: J. Histochem. Cytochem. **10**, 660, 1962.
16. Riotton G., Fishman W. H.: Endocrinology, **52**, 692—697, 1953.
17. Stolk A.: Nature, **194**, 692—693, 1962.
18. Wysocki J.: Pol. Arch. Med. Wewn. **35**, 1031—1036, 1965.

Pracę otrzymano 30 XII 1967

OBJAŚNIENIA DO RYCIN

Ryc. 1. Nabłonek macicy świnki morskiej kontrolnej. Wyraźny ziarnisty odczyn na β -glikuronidazę. Mikroskop Lumipan Zeiss. Obiektyw 20 \times , okular Homal II. Kamera „Standard”.

Рис. 2. Gruczoły i warstwa właściwa błony śluzowej macicy świnki morskiej kontrolnej. Wybitna reakcja barwna w gruczołach, świadcząca o wysokiej aktywności β -glikuronidazy, miernie nasiloną w śluzówce właściwej. Mikroskop Lumipan Zeiss. Obiektyw 20 \times , okular Homal II. Kamera „Standard”.

Рис. 3. Mięsień macicy świnki morskiej kontrolnej z licznymi, drobnymi ziarenkami β -glikuronidazy. Mikroskop Lumipan Zeiss. Obiektyw 20 \times , okular Homal II. Kamera „Standard”.

Рис. 4. Wątroba świnki morskiej kontrolnej. Wysoka aktywność β -glikuronidazy w komórkach wątroby i w ścianie przewodu żółciowego międzyzrazikowego, mniejsza znacznie w tkance łącznej i w ścianach naczyń krwionośnych. Mikroskop Lumipan Zeiss. Obiektyw 20 \times , okular Homal II. Kamera „Standard”.

Рис. 5. Błona śluzowa macicy świnki morskiej z ok. 20 dnia ciąży. Różne nasilenie odczynu barwnego na β -glikuronidazę w nabłonku, wybitnie intensywne w gruczołach, mierne w śluzówce właściwej. Mikroskop Lumipan Zeiss. Obiektyw 20 \times , okular Homal II. Kamera „Standard”.

Рис. 6. Wątroba świnki morskiej z ok. 20 dnia ciąży. Wybitnie dodatni odczyn na β -glikuronidazę w komórkach wątroby. Mikroskop Lumipan Zeiss. Obiektyw 20 \times , okular Homal II. Kamera „Standard”.

Гистохимические исследования активности β -гликуронидазы в печени и матке беременных морских свинок

Резюме

Настоящие исследования проводились на небеременных (контрольных) и беременных (20—60 дней беременности) морских свинок. Присутствие β -гликуронидазы в печени и матке обнаруживали при помощи метода Seligmana, Tsou, Rutenburga и Cohena.

В результате проведенных наблюдений установлено, что печень характеризуется высокой активностью β -гликуронидазы, которая под влиянием беременности не подвергается изменениям. В матке контрольных животных большая активность β -гликуронидазы была обнаружена в эпителии и железах, малая же — в слизистой и мышечной оболочках. На 20-ый день беременности наступила разница в интенсивности цветной реакции на отдельных участках эпителия, а на 60-ый день беременности — ослабление энзиматической реакции во всей стенке матки

Recherches histochimiques sur l'activité de la β -glycuronidase dans le foie et dans l'utérus pendant la grossesse chez le cobayes

Résumé

Les recherches ont été faites sur les cobayes non enceintes (celles de contrôle) et enceintes depuis 20 et depuis 60 jours. La β -glycuronidase était découverte dans le foie et l'utérus par la méthode de Seligman,

Tsou, Rutenburg et Cohen. En résultat des observations faites on a constaté que le foie se caractérisait par une forte activité de la β -glycuronidase n'ayant pas subi des altérations sous l'influence de la grossesse. Dans l'utérus des animaux de contrôle on a observé que l'activité de la β -glycuronidase dans l'épithélium et dans les glandes était forte, tandis qu'elle était faible dans la muqueuse propre et dans la couche musculaire. Le 20^e jour de la grossesse on a constaté les différences dans l'activité de la réaction de coloration dans les secteurs particuliers de l'épithélium; le 60^e jour de la grossesse a eu lieu l'affaiblissement de la réaction enzymatique dans la paroi entière de l'utérus.

EXPLICATIONS DES FIGURES

Fig. 1. Épithélium de l'utérus chez le cobaye de contrôle. Réaction granuleuse distincte à la β -glycuronidase. Microscope Lumipan Zeiss. Objectif 20 \times , oculaire Homal II. Caméra „Standard”.

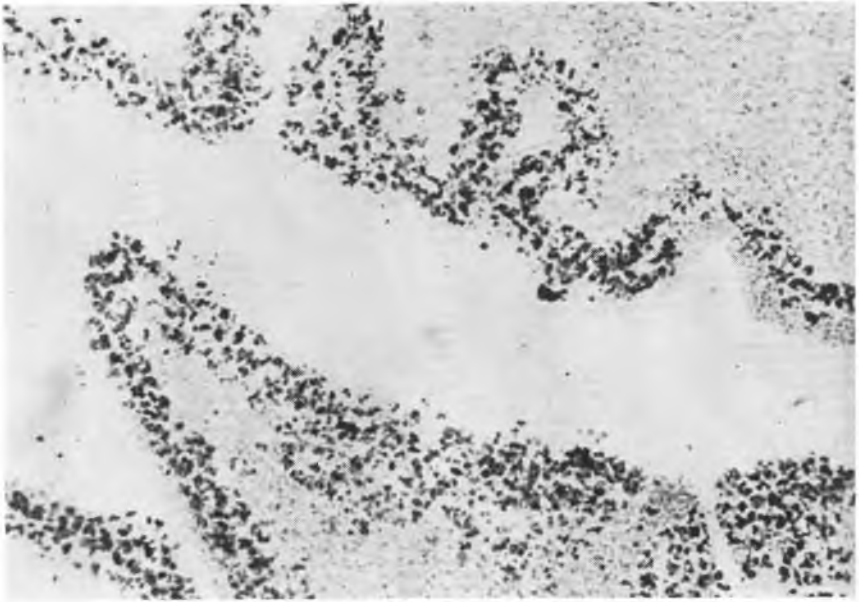
Fig. 2. Glandes et couche propre de la muqueuse de l'utérus chez le cobaye de contrôle. Réaction de coloration, très forte dans les glandes, témoignant d'une activité élevée de la β -glycuronidase; réaction moyenne dans la muqueuse propre. Microscope Lumipan Zeiss. Objectif 20 \times , oculaire Homal II. Caméra „Standard”.

Fig. 3. Muscle de l'utérus chez le cobaye de contrôle avec nombreuses fines granulosités de la β -glycuronidase. Microscope Lumipan Zeiss. Objectif 20 \times , oculaire Homal II. Caméra „Standard”.

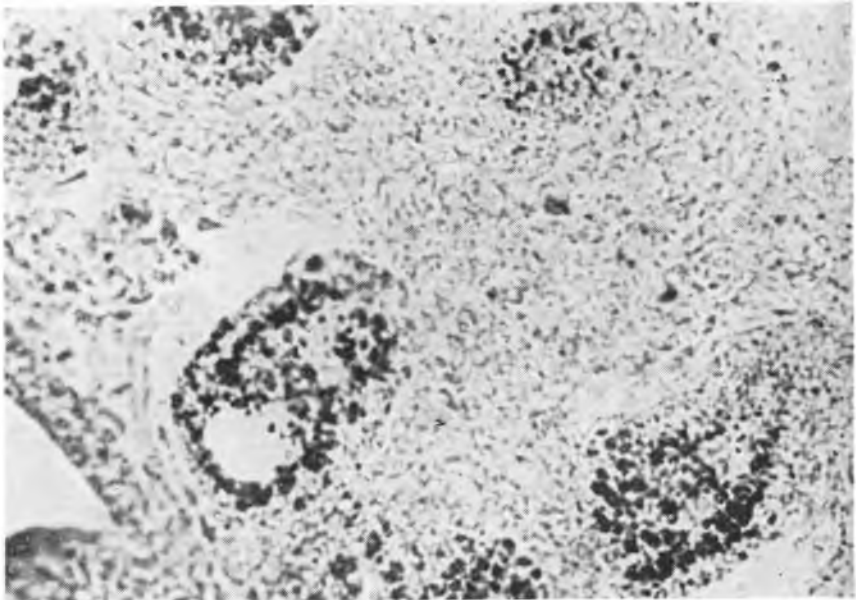
Fig. 4. Foie du cobaye de contrôle. Activité élevée de la β -glycuronidase dans les cellules du foie et dans la paroi de la voie biliaire hépatique interlobulaire; activité considérablement moindre dans le tissu conjonctif et dans les parois des vaisseaux sanguins. Microscope Lumipan Zeiss. Objectif 20 \times , oculaire Homal II. Caméra „Standard”.

Fig. 5. Muqueuse de l'utérus chez le cobaye environ le 20^e jour de la grossesse. Intensité de la réaction de coloration à la β -glycuronidase, diverse dans l'épithélium, très forte dans les glandes, moyenne dans la muqueuse propre. Microscope Lumipan Zeiss. Objectif 20 \times , oculaire Homal II. Caméra „Standard”.

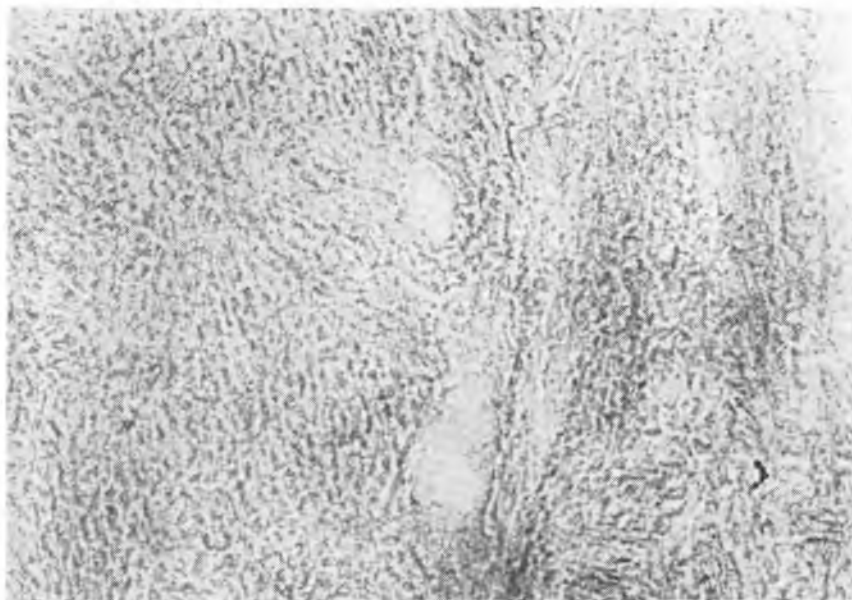
Fig. 6. Foie du cobaye environ le 20^e jour de la grossesse. Réaction à la β -glycuronidase très positive dans les cellules du foie. Microscope Lumipan Zeiss. Objectif 20 \times , oculaire Homal II. Caméra „Standard”.



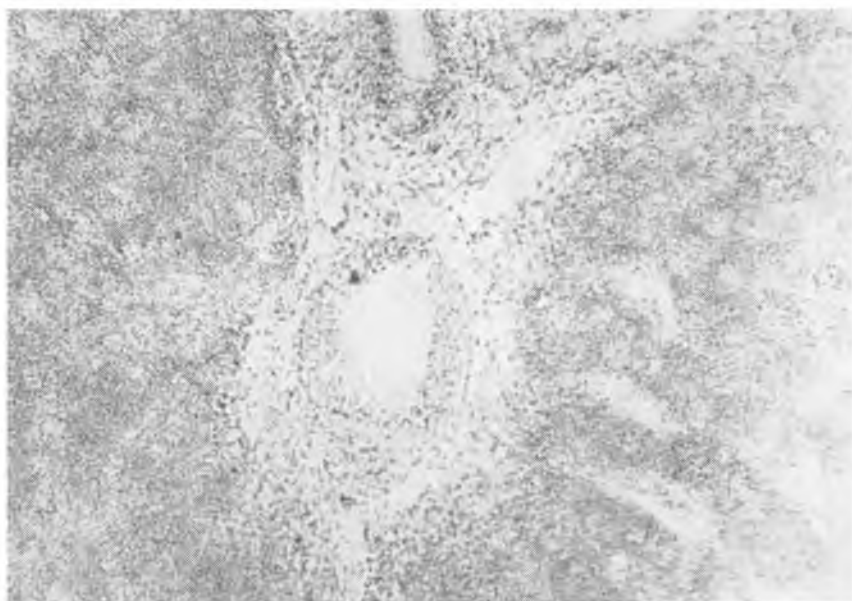
Ryc. 1



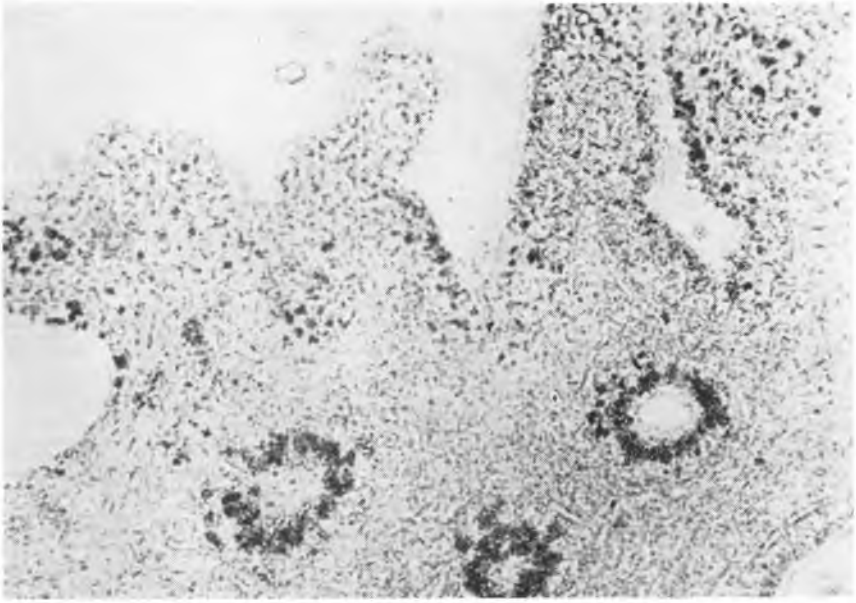
Ryc. 2



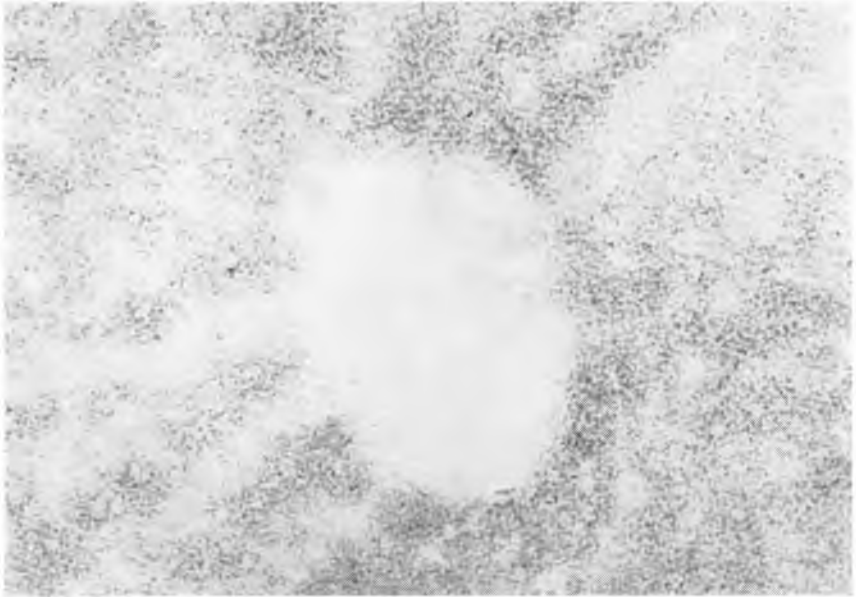
Ryc. 3



Ryc. 4



Ryc. 5



Ryc. 6

