

Katedra i Zakład Anatomii Patologicznej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: prof. dr med. Marian Rozynek  
Klinika Ogólna Chorób Wewnętrznych. Instytut Chorób Wewnętrznych. Akademia Medyczna  
w Lublinie  
Kierownik: prof. dr med. Witold Szewczykowski

Andrzej STĘPIEŃ, Janusz HANZLIK,  
Jerzy ŁOPATYŃSKI, Ireneusz WOLAŃSKI

### **Badania morfologiczne i histochemiczne aorty u królików z doświadczalną miażdżycą cholesterolową i cukrzycą alloxanową**

Морфологические и гистохимические исследования аорты у кроликов  
с опытным холестериновым склерозом и аллоксановым сахарным диабетом

Morphological and Histochemical Research of the Rabbit Aorta with Experimental  
Cholesterol Atheromasia and Alloxan Diabetes

Autorzy oceniali nasilenie rozwoju zmian morfologicznych powstałych pod wpływem diety miażdżycorodnej oraz cukrzycy alloxanowej w aorcie u królika. Największe zmiany morfologiczne, typowe dla tzw. „miażdżycy doświadczalnej”, obserwowano u zwierząt otrzymujących dietę miażdżycorodną u których wywołano także cukrzycę alloxanową. Nieco mniejsze zmiany obserwowano u zwierząt przebywających tylko na diecie miażdżycorodnej. Wpływ samej cukrzycy alloxanowej na rozwój miażdżycy doświadczalnej w badanym materiale był nieznaczny.

Przedstawiona praca stanowi część morfologiczną badań nad zmianami zachodzącymi w ścianie naczyniowej pod wpływem czynników znanych jako przyśpieszające miażdżycę naczyń, do których zaliczana jest także i cukrzyca. Prowadzone równolegle badania nad glikozoaminoglikanami, kolagenem i elastynem ściany naczyniowej oraz zmianami humoralnymi w tych samych warunkach doświadczalnych są przedmiotem osobnych doniesień (7, 10, 20).

#### **MATERIAŁ I METODYKA**

Badania prowadzono na 37 królikach podzielonych na 4 grupy doświadczalne: I — grupa kontrolna; II — grupa zwierząt, otrzymujących dietę miażdżycorodną (cholesterol w ilości 0,5 g/kg c. wyjściowego przez okres 100 dni); III — grupa zwierząt, którym wstrzykiwano do żyły brzożnej ucha 5% roztwór alloxanu w il. 100 mg/kg c. wyjściowego zwierzęcia; IV — grupę stanowiły zwierzęta przebywające na diecie miażdżycorodnej, którym dodatkowo podawano alloxan (dawka i spo-

sób podania jw.). Alloksan podawano zwierzętom w 86 dniu doświadczenia (na dwa tygodnie przed jego planowanym zakończeniem). Szereg szczegółów metodycznych dotyczących sposobu przeprowadzania doświadczenia jest podany w innych pracach (7, 10, 20).

Nasilenie zmian morfologicznych oceniano zarówno makroskopowo, jak mikroskopowo. Makroskopowej oceny zmian w aorcie dokonywano natychmiast po jej wypreparowaniu i dokumentowano fotograficznie. Do badań mikroskopowych pobierano poprzeczne wycinki z dolnej części aorty, zazwyczaj tuż powyżej jej podziału na tt. biodrowe wspólne. Od każdego zwierzęcia pobierano cztery wycinki po ok. 1—2 mm szerokości do następujących płynów utrwalających: 1) 10% buforowana formalina 2) płyn Bakera, 3) chlorek cetylopirydyniowy, 4) płyn Genre'a. Skrawki parafinowe barwiono: a) hematoksyliną i eoźną, b) błękitem alcjanu wg Steedmana, c) met. p. a. S. wg Mc. Manus'a, d) p. a. S. z kontrolą diastazą, e) rezorcyną-fuksyną wg Weigerta, f) Sudanem IV wg Daddi'ego, g) digitoniną wg Lison'a, h) wg met. Wachstein-Meisela w modyfikacji Vorbrota na ATP-azę. Do poszczególnych barwien pobierano wycinki z odpowiednich płynów utrwalających.

Prócz wycinków z tętnicy głównej badano wycinki z wątroby, nerek, trzustki, śledziony, mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych celem stwierdzenia rozwoju zmian zależnych bądź to od podawania alloksanu, bądź od hiperlipidemii i ustalenia ew. korelacji tych ostatnich z nasileniem zmian w tętnicy głównej. Wycinki z wymienionych narządów barwiono wg czterech kolejnych barwien podanych uprzednio (a-d). Wycinki z wątroby i śledziony dodatkowo barwiono Sudanem IV, a wycinki z trzustki fuksyną aldehydową wg met. Gomoriego celem oceny komórek beta wysp Langerhansa. Preparaty oglądano w mikroskopie świetlnym używając powiększeń od 100—400X.

#### WYNIKI BADAŃ

Badania makroskopowe: w grupie kontrolnej (I) oraz w grupie zwierząt, które otrzymywały injekcje alloksanu (III) zmian makroskopowych nie stwierdzano. W grupach II i IV — zwierząt przebywających na diecie miazdźcorodnej (II) i otrzymujących dodatkowo injekcje alloksanu (IV) — obserwowano zmiany w postaci szarawożółtawych, płaskowyniosłych plam, zgrubień i prążków w obrębie błony wewnętrznej aorty. Nasilenie zmian wśród zwierząt tych samych grup doświadczalnych było indywidualnie zmienne i zazwyczaj większe u zwierząt o większym ciężarze. Największe zmiany lokalizowały się w miejscach odejścia drobniejszych naczyń od aorty, głównie w obrębie jej łuku, stopniowo zmniejszając swe nasilenie w kierunku distalnym. Nasilenie zmian wśród zwierząt grup II i IV na ogół było podobne, choć wydaje się, że nieco rozleglejsze zmiany obserwowano u zwierząt grupy IV (ryc. 1—2).

Badania mikroskopowe: w barwieniu hematoksyliną i eoźną aorty zwierząt doświadczalnych grup II i IV wykazywały różnego stopnia pogrubienie i obrzmienie błony wewnętrznej. Miejscami obserwowano pagórkowate uniesienie i pogrubienie śródbłonna i odsunięcie go od błony elastycznej wewnętrznej przez bladorożowo barwiącą się, homogenną substancję. Elementy mięśniowe ściany aorty u zwierząt tych grup do-



Ryc. 1. Nieznaczące nasilenie zmian miażdżycowych. Gr. IV. Obraz makroskopowy



Ryc. 2. Wybitnie wyrażone zmiany miażdżycowe. Gr. II. Obraz makroskopowy

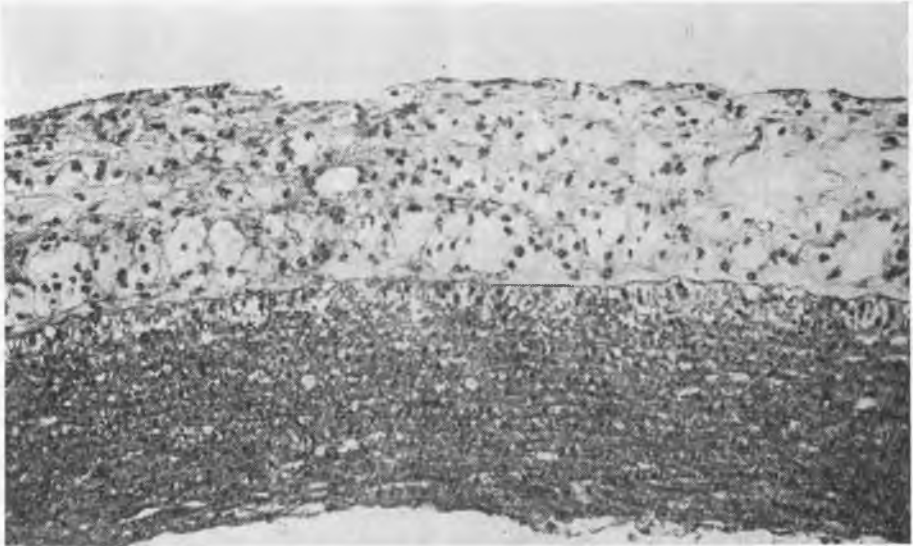
świadczałnych (II i IV) były jakby napęczniałe, a ich cytoplazma barwiła się słabiej eozyną. U kilku zwierząt (gr. II i IV) obserwowano w ścianie aorty tuż pod śródbłonkiem, a także głębiej (lecz zawsze w 1/3 wewnętrznej ściany) komórki dość różnokształtne o jasnej, piankowatej cytoplazmie z małym okrągłym jądrem i wyraźną na ogół błoną komórkową (ryc. 3—6). W grupie I zmian mikroskopowych w barwieniu tym nie obserwowano. W grupie II niekiedy widoczne było nieznaczne obrzmienie śródbłonek, a także gorsza barwność komórek mięśni gładkich.

W barwieniach wg met. paS i paS z diastazą wyraźniej były widoczne wyżej opisane przestrzenie podśródbłonkowe i komórki piankowate

(były one paS ujemne) — przez kontrast z elementami ściany tętnicy głównej barwiącymi się paS dodatnio. W grupach II i IV oraz w znacznie mniejszym stopniu w grupie III (w porównaniu z grupą kontrolną), struktura ściany aorty była częściowo zatarta, a poszczególne elementy wydawały się być pogrubiłe z powodu obrzęku.



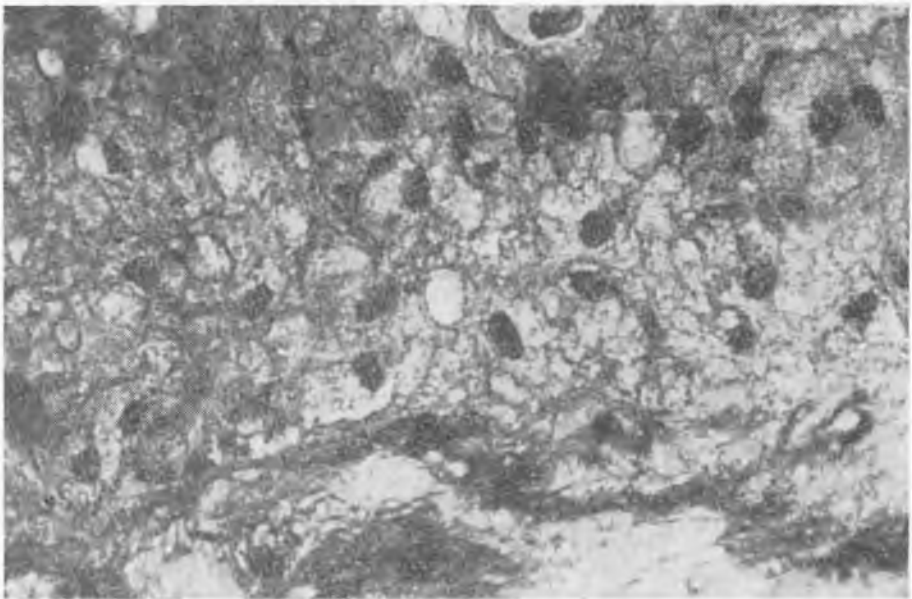
Ryc. 3. Nieznaczne nagromadzenie komórek piankowatych. Barwienie H+E. Powiększenie 100×. Gr. IV



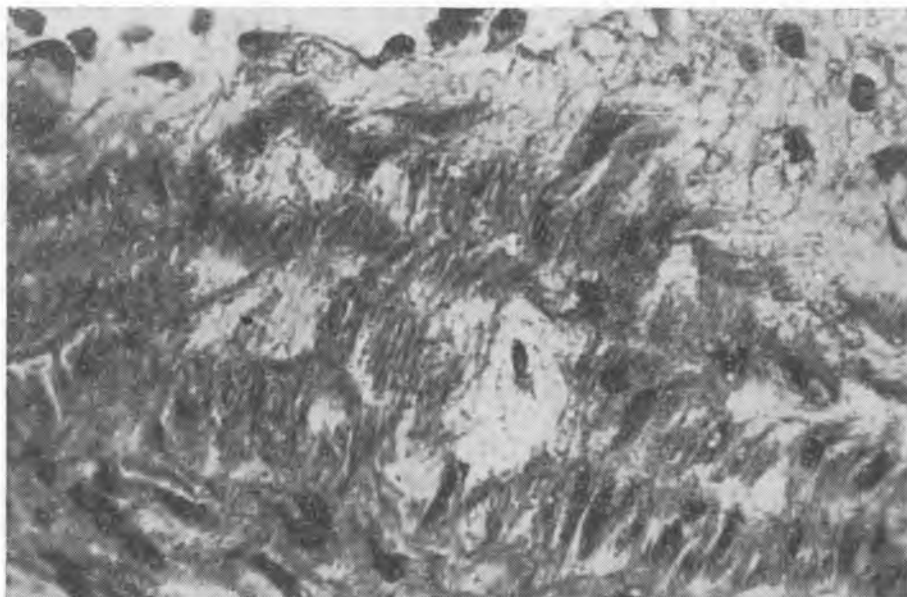
Ryc. 4. Rozległe zmiany w obrębie błony wewnętrznej aorty. Liczne komórki piankowate. Barwienie H+E. Powiększenie 100×. Gr II

Barwienie rezorcyną-fuksyną pozwoliło ponownie wyraźnie dostrzec obrzęk podśródkłonkowy oraz śródścienny aorty. W porównaniu z grupą kontrolną, włókna elastyczne ściany naczyniowej były znacznie bardziej porozsuwane. Miejscami można było dostrzec ich skrócenie, większe pofalowanie i pęknięcia (ryc. 7—8). Podobnie jak w innych barwieniach wydaje się, że największe zmiany występowały u zwierząt gr. IV nieznacznie tylko mniejsze w grupie II, natomiast wyraźnie mniejsze w grupie III (największe podobieństwo do grupy kontrolnej).

W barwieniu błękitem alcjanu stwierdzano silniejsze, niebieskawe wybarwienie się ściany aorty u zwierząt, u których obserwowano znaczniejsze zmiany makroskopowe oraz mikroskopowe także i w innych barwieniach. Poza tym można było zauważyć tworzenie się jakby „jezierek” barwiących się niebiesko, rozsuwających elementy elastyczne i mięśniowe. Zmian takich nie zauważono u zwierząt kontrolnych. W badaniach biochemicznych ściany aorty obserwowano zdecydowane zwiększenie liczby glikozoaminoglikanów szczególnie u zwierząt z cukrzycą alloxanową, przebywających także na diecie miazdźcorodnej, nieco mniejsze u zwierząt pozostających jedynie na diecie cholesterolowej. Bładoniebieskawo wybarwiała się także wyżej opisywana homogenna substancja podśródbłonkowa oraz substancja wypełniająca przestrzenie między komórkami piankowatymi.



Ryc. 5. Zmiany jak na ryc. 4. Pow. 400 $\times$ . Komórki piankowate liczne, różnego kształtu i wielkości



Ryc. 6. Pojedyncza komórka piankowa wynikająca głębiej w ścianę aorty. Dane jw.

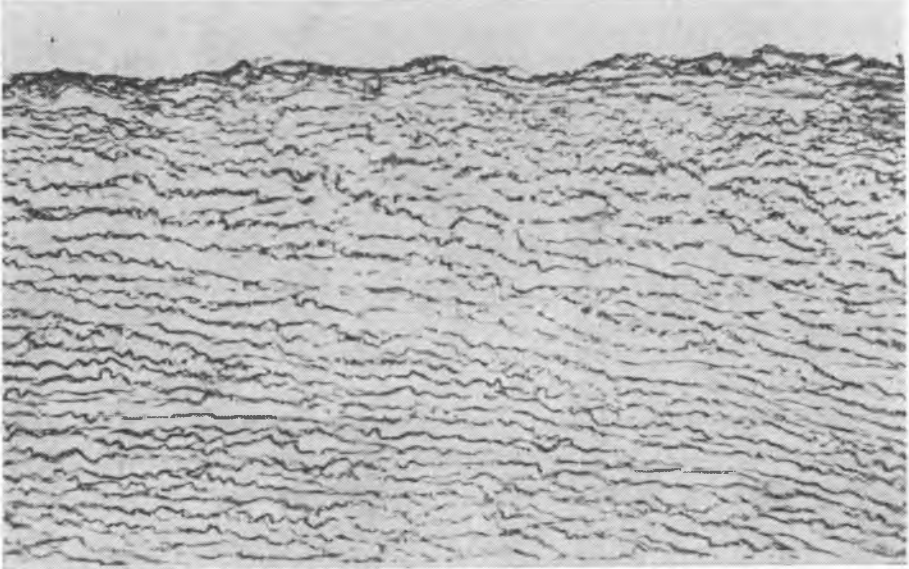
Barwienie Sudanem IV i digitoniną na obecność ciał tłuszczowatych i cholesterolu pozwoliło zaobserwować sudanochłonne złoże, które występowały w różnym nasileniu u poszczególnych zwierząt. Zmiany te występowały bądź w postaci drobnych kropelek, bądź większych, miejscami zlewających się ze sobą kropelek, zlokalizowanych w obrębie śródbłonna lub też pod nim (ryc. 9—10). W grupie III występowały jedynie bardzo drobne kropelki sudanochłonne. Różnice obrazu mikroskopowego między tą grupą zwierząt doświadczalnych a grupą kontrolną były jednak najwyraźniejsze w tych ostatnich barwieniach. W grupie II i IV nasilenie tego typu zmian korelowało z nasileniem zmian obserwowanych i w innych barwieniach.

W barwieniu na obecność ATP-azy nie obserwowano znaczniejszych różnic między zwierzętami kontrolnymi a zwierzętami grup doświadczalnych.

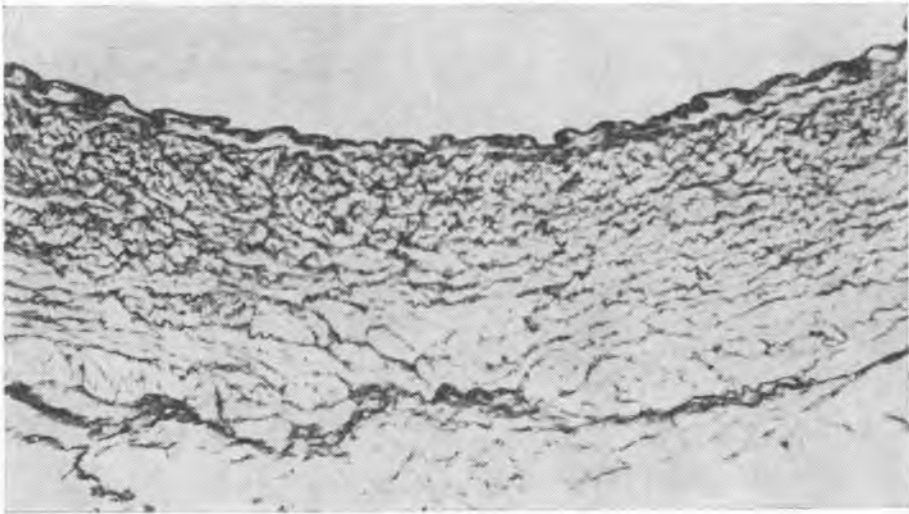
W badanych dodatkowo narządach występujące zmiany można było podzielić na dwie grupy: a) zmiany zależne od toksycznego działania alloksanu; b) zmiany zależne od czynników miażdżycorodnych.

Ad. a) w przypadku stosowania alloksanu zmiany toksyczne występowały wybiórczo w obrębie wysp Langerhansa trzustki. W naszym materiale w grupach III i IV zwierząt doświadczalnych obserwowano mikroskopowo różną wielkość wysp Langerhansa, od małych składających

się z kilku komórek, do olbrzymich 2—4× większych niż u zwierząt kontrolnych. W barwieniu H+E zarówno w obrębie małych, jak i dużych wysp stwierdzaliśmy obecność szklistej, bladoróżowo barwiącej się substancji zarówno na obwodzie wysp, jak i między ich komórkami. W barwieniu fuksyną aldehydową wg Gomoriego stwierdzano wśród zwierząt



Ryc. 7. Nieznaczny obrzęk ściany (rozsunięcie włókien sprężystych). Barwienie rezorcyną-fuksyną. Powiększenie 100×. Gr. III



Ryc. 8. Pogrubienie, rozwarstwienie i nieregularny przebieg włókien sprężystych, Gr. IV. Barwienie rezorcyną-fuksyną. Pow. 100×

gr. III i IV zmniejszanie się stosunku komórek  $\beta$  wysp Langerhansa (zawierających czerwono-fioletowe ziarnistości) do komórek jasnych bez ziarnistości. Stosunek ten w grupach I i II wynosił zazwyczaj 4 : 1, natomiast w grupach III i IV 1 : 1 lub był mniejszy (1 : 2).

Ad. b) w narządach takich, jak: serce, nerki, i mięśnie szkieletowe zmiany dotyczyły głównie drobnych naczyń tętniczych, których ściana ulegała pogrubieniu i barwiła się intensywniej met. paS i paS z diastazą. Natomiast w wątrobie i śledzionie zmiany polegały na gromadzeniu ciał tłuszczowatych (różnego stopnia nasilenie zmian w barwieniu Sudanem IV) przez hepatocyty oraz komórki obwodu grudek śledzionowych i niekiedy komórki miazgi czerwonej śledziony. Nasilenie zmian naczyniowych oraz stłuszczenia było w poszczególnych przypadkach różne i korelowało z nasileniem zmian w aorcie.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Z patologii człowieka wiadomo, że cukrzyca jest jednym z czynników przyspieszających i nasilających rozwój miażdżycy naczyń. Wg współczesnych danych w odniesieniu do patogenezy miażdżycy naczyń, zmiany zachodzące w ścianie naczyniowej, obok zaburzeń metabolizmu i transportu lipidów oraz zmian hemodynamicznych, mają mieć podstawowe znaczenie w aterogenezie (1, 2, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 18, 19, 22). W badaniach własnych największe zmiany obserwowano w grupach zwierząt przebywających na diecie miażdżycorodnej, które otrzymały iniekcje alloxanu. Stwierdzane zmiany tak makro-, jak i mikroskopowe były charakterystyczne dla tzw. „miażdżycy doświadczalnej” (1, 2, 3, 4, 8, 19).



Ryc. 9. Niewielkie zmiany drobnokropelkowe w obrębie intymy i podintymalne. Barwienie Sudanem IV. Powiększenie 100 $\times$ . Gr. III





Ryc. 10. Rozległe, zlewające się zmiany widoczne w barwieniu Sudanem IV.  
Powiększenie 100×. Gr. IV

Alloksan jako środek wybiórczo toksyczny dla komórek  $\beta$  wysp Langerhansa trzustki jest często stosowany dla wywołania doświadczalnej cukrzycy (5, 6, 9, 17, 21, 24). Stosowanie alloksanu w naszym doświadczeniu spowodowało wystąpienie typowych zmian biochemicznych w surowicy krwi (9, 14, 16, 17, 23) nie wpłynęło natomiast wyraźnie na wystąpienie znaczniejszych zmian morfologicznych w obrębie ściany tętnicy głównej obserwowanych przy pomocy wyżej opisanych metod. Podobnie nie udało się wykazać, by stosowanie alloksanu wzmagало w sposób istotny zmiany naczyniowe (miażdżycowe) u zwierząt przebywających na diecie miażdżycorodnej.

Na podstawie przeprowadzonych badań morfologicznych ściany tętnicy głównej i innych narządów królika, po stosowaniu alloksanu i diety miażdżycorodnej w krótkotrwałym doświadczeniu wyprowadzono następujące wnioski:

1. Jednorazowe podanie alloksanu nie powoduje wystąpienia znaczniejszych zmian morfologicznych w obrębie tętnicy głównej i innych tkanek królika, prócz specyficznego toksycznego działania na komórki  $\beta$  wysp Langerhansa trzustki.

2. W badanym materiale stwierdzono morfologicznie uchwytne zmiany ilościowe i topograficzne mukopolisacharydów. Zmiany te najwyraźniej występowały u zwierząt z cukrzycą alloksanową przebywających jednocześnie na diecie miażdżycorodnej.

## PIŚMIENNICTWO

1. Cholewa J.: Badania morfologiczne nad rozwojem doświadczalnej cholesterolowej miażdżycy tętnic wieńcowych królika pod wpływem kofeiny. 1968 (praca doktorska — AM Lublin).
2. Constantinides P., Booth J., Carlson G.: Arch. Path. **70**, 712—721, 1960.
3. Duff G., Mc. Millan G.: J. Exp. Med. **89**, 611—630, 1949.
4. Duff G., Payne T.: J. Exp. Med. **92**, 299—317, 1950.
5. Duffy E.: J. Path. Bacteriol. **57**, 199—212, 1945.
6. Dunn J., Sheehan N., Mc. Letchie N.: Lancet. **6242**. 484—487, 1943.
7. Hanzlik J., Tomaszewski J., Łopatyński J., Wolański I., Gelatowska B.: Glikozaminoglukany ściany tętnicy głównej królika po podaniu diety miazdźcorodnej i wywołaniu cukrzycy alloksanowej (praca przyjęta do druku w PAMW).
8. Imai H., Lee K., Pastori S. i wsp.: Exp. Molec. Path. **5**, 273—310 1966.
9. Lundquist I.: Acta Physiol. Scand. Suppl. **372**, 1971.
10. Łopatyński J., Tomaszewski J., Wolański I., Hanzlik J., Zawiaślak H., Kozak E.: Badania nad wpływem podawania diety miazdźcorodnej i doświadczalnej cukrzycy na niektóre wskaźniki gospodarki węglowodanowej, tłuszczowej i białkowej w surowicy krwi królików (praca przyjęta do druku w PAMW).
11. Moore J., Williams D.: Brit. J. Nutr. **18**, 431—448, 1964.
12. Orci L., Junod A., Pictet R. i wsp.: J. Cell. Biol. **38**, 462—466, 1968.
13. Parker F., Odland G.: Amer. J. Path. **48**, 451—481, 1966.
14. Pierce F. jr.: Circulation. **5**, 401—407, 1952.
15. Pollak O.: J. Amer. Geriatric Soc. **6**, 614—619, 1959.
16. Rerup C.: Diabetol. **38**, 462—470, 1968.
17. Rerup C.: Pharmacol. Rev. **22**, 485—518, 1970.
18. Sinapius D.: Virch. Arch. path. Anat. **338**, 150—158, 1964.
19. Studer A., Reber K.: Ergebn. allg. Path. anat. **23**, 2—87, 1963.
20. Tomaszewski J., Hanzlik J., Wolański I., Łopatyński J., Grzywa M., Zawiaślak H.: Badania nad zawartością kolagenu, elastynu w ścianie tętnicy głównej królików po podawaniu diety miazdźcorodnej i wywołaniu cukrzycy alloksanowej (praca przyjęta do druku w PAMW).
21. Volk B., Lazarus S., Wellmann K.: Diabetes. **14**, 792—804, 1965.
22. Wellmann K., Volk B.: Arch. Path. **90**, 206—215, 1970.
23. Wellmann K., Volk B.: Lab. Invest. **22**, 36—53, 1970.
24. Wellmann K., Volk B., Lazarus S.: Diabetes. **16**, 242—251, 1967.

Otrzymano 11 V 1973.

## РЕЗЮМЕ

Представленная работа является морфологической частью исследований изменений, происходящих в сосудистой стенке под влиянием факторов, известных как ускоряющие склероз сосудов. Усиление морфологических изменений, возникших у кроликов с аллоксановым сахарным диабетом, которые одновременно находились на диете, способствующей

склерозу, было довольно значительным, но только немного большим, чем усиление подобных изменений у животных, которые находились на холестериновой диете. Сам аллоксановый сахарный диабет (в кратковременном опыте) имеет небольшое влияние на атерогенез.

## S U M M A R Y

The presented paper is the morphological part of studies on the alterations taking place in the vascular wall under the influence of elements which activate atherosclerosis. The intensification of morphological alternations arising in rabbits with alloxan diabetes, which were at the same time on a thrombosis-inducing diet, were rather significant, but not much larger than the intensification of similar alternations in animals remaining on a cholesterol diet only. Alloxan diabetes alone (in experiments of a short duration) has a small effect on arteriogenesis.

## EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. An insignificant intensification of atheromatous alternations. Group IV. Macroscopic picture.

Fig. 2. Distinctly expressed atheromatous alternations. Group II. Macroscopic picture.

Fig. 3. An insignificant accumulation of foam cells. H+E staining. Enlargement 100×. Group IV.

Fig. 4. Extensive alternations in the internal membrane area of the aorta. Numerous foam cells. H+E staining. Enlargement 100×. Group II.

Fig. 5. Alternations as in fig. 4. Enlargement 400×. Numerous foam cells of various shape and size.

Fig. 6. Single foam cells penetrating deeper into the aorta wall. Data as above.

Fig. 7. An insignificant swelling of the wall (the separation of elastic fibres). Resorcin-fuchsine staining. Enlargement 100×. Group III.

Fig. 8. The thickening, stratification and irregular course of elastic fibres. Group IV. Resorcin-fuchsine staining. Enlargement 100×.

Fig. 9. Small small-roplet alternations in the intima and under-intima area. Sudan IV staining. Enlargement 100×. Group III.

Fig. 10. Extensive merging alternations visible in the Sudan IV staining. Enlargement 100×. Group IV.

