

Zakład Histologii i Embriologii. Instytut Biologiczno-Morfologiczny. Wydział Lekarski.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Irena KRÓLIKOWSKA-PRASAŁ
Elżbieta NIEROJEWSKA

Wpływ pilokarpiny na odczyny histochemiczne mukopolisacharydów w jelicie cienkim szczura białego

Влияние пилокарпина на гистохимическую реакцию мукополисахаридов в тонкой
кишке белых крыс

The Influence of Pilocarpine on Histochemical Reaction of Mukopolysaccharides
in the Small Intestine of White Rats

Jednym ze związków farmakologicznych działających pobudzająco na zakończenia układu przywspółczulnego jest pilokarpina. Pobudza ona przede wszystkim zakończenia nerwów zaopatrujących gruczoły łzowe, ślinowe, potowe, błon śluzowych i gruczołów trawiennych (Dadlez i Kubikowski, 1970). Zabłocka i Esplin (16) badając wpływ pilokarpiny na centralny układ nerwowy myszy i szczura wykazali, że posiada ona zarówno właściwości pobudzające, jak i antydrżawkowe. A. Wołkowa i Jakowlewa (15) prowadząc badania na siatkówce gałki ocznej królika zauważyły obniżoną aktywność bioelektryczną siatkówki po wprowadzeniu pilokarpiny. Natomiast Sokołowska-Hallioy (12) podaje, że pilokarpina powoduje zwiększenie wydzielania soku żołądkowego, zaś Robbrecht (9), że wpływa na wydzielanie egzokrynowe trzustki. Zaburzenia w produkcji wydzieliny, jak wykazali Cooke i Cooke (1) oraz Marks (7), wywołują inne środki farmakologiczne, np. histamina.

Ponieważ wiadomym jest, że najbardziej intensywne procesy resorpcji pokarmu zachodzą w jelicie cienkim, a metabolizm komórek nabłonka jelitowego może być zakłócony różnymi środkami farmakologicznymi (Grzycki i Królikowska-Prasał, 1972, Kilkowska i wsp., 1971) wydało się nam celowe prześledzenie zmian histochemicznych mukopolisacharydów w jelicie cienkim szczura, zachodzących pod wpływem różnych dawek i czasu działania pilokarpiny.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono na szczurach białych (samcach), hodowli wsobnej, ciężaru 100—200 g. Wszystkie zwierzęta karmione były w tym samym czasie i otrzymywały standardową dietę. W badaniach wyodrębniono 4 grupy doświadczalne

i grupę kontrolną. W I grupie doświadczalnej wstrzykiwano zwierzętom podskórnie 1 ml chlorowodoru pilokarpiny (W.Z.F. Polfa ser. 10369), który zawierał 1,1 mg czystego chlorowodoru, co odpowiadało dawce 10 mg/kg na jedno zwierzę. Po 60 minutach szczury dekapitowano, a następnie pobierano wycinki z jelita cienkiego. Zwierzęta z II grupy doświadczalnej były przygotowane do badań (podobnie jak z grupy I) z tym, że wycinki jelita pobierano po 2 godzinach po iniekcji.

Szczurom III grupy doświadczalnej wstrzykiwano 1 ml chlorowodoru pilokarpiny, który zawierał 10,1 mg suchej masy substancji, co odpowiada 60 mg/kg na jedno zwierzę. Po 1 godzinie zwierzęta dekapitowano i pobierano wycinki z jelita. Szczury grupy IV przygotowywano do badań jak z grupy III, z tym że wycinki jelita pobierano po 2 godzinach. Szczurom grupy kontrolnej podawano podskórnie 1 ml płynu fizjologicznego.

Pobrane wycinki jelita z grup doświadczalnych i grupy kontrolnej utrwalano w płynie Carnoy'a i Gendrea, a następnie na skrawkach parafinowych wykonywano odczyn histochemiczne na mukopolisacharydy kwaśne z błękitem astra według Blooma i Kellego oraz z błękitem alcjanowym wg Mowry. Mukopolisacharydy obojętne wykazano stosując reakcję PAS oraz próby kontrolne z diastazą i dimedonem. Wykonano również barwienie podstawowe preparatów hematoksyliną i eozyną.

BADANIA WŁASNE

I grupa doświadczalna (10 mg/kg — 1 godz.)

Na preparatach I grupy doświadczalnej barwionych na mukopolisacharydy obojętne w reakcji PAS obserwowano bardziej intensywne odczyny w komórkach śluzowych znajdujących się w różnych fazach wydzielania w porównaniu z kontrolą (ryc. 1). Jedne z nich były okrągłe, bardziej obrzmiałe, wypełnione wydzieliną, inne zwężone z wydzieliną widoczną nad jej powierzchnią (ryc. 2). Średnia ilość mukocytów w nabłonku jednego kosmka nie ulegała większym zmianom w stosunku do grupy kontrolnej i wynosiła średnio 24—28 komórek. Odczyny PAS dodatnie występowały również w enterocytach oraz komórkach dna gruczołów — komórkach Panetha i w zrębie łącznotkankowym.

Odczyny na mukopolisacharydy kwaśne barwione błękitem alcjanowym wg Mowry wykazywały większą intensywność niż w grupie kontrolnej (ryc. 3). Zaobserwowano, że mukocyty znajdują się w różnych stadiach wydzielania, a wyrzucany przez nie śluz tworzy przerywane pasmo substancji wokół nabłonka kosmków (ryc. 4). Analogiczne odczyny otrzymano podczas barwienia mukopolisacharydów kwaśnych błękitem astra wg metody Blooma i Kellego.

II grupa doświadczalna (10 mg/kg — 2 godz.)

Dwugodzinne działanie pilokarpiny wywołuje większe zmiany w nabłonku jelitowym niż w 1 godzinie. Świadczą o tym intensywne odczyny na mukopolisacharydy obojętne w komórkach nabłonka zarówno w enterocytach, jak i mukocytach (ryc. 3). Liczba komórek śluzowych wzrasta, większość z nich widoczna jest w części przypodstawnej kosmków. Po-

nadto zauważono zmiany w kształcie mukocytów. Najczęściej spotykano komórki wydłużone, rzadziej widoczne były mukocyty balonowate w początkowej fazie wydzielania z silnym odczynem PAS. Wydzielina wyrzucana przez komórki śluzowe na zewnątrz przylegała w znacznych ilościach do nabłonka jelitowego, otaczając kosmki ciągłym, szerokim pasmem. Mukopolisacharydy kwaśne wykazane w reakcji z błękitem astra i błękitem alcjanowym dawały silne odczyny w mukocytach w stadium wydzielniczym i słabsze po usunięciu z nich wydzieliny na zewnątrz. Mniej intensywne odczyny widoczne były w enterocytach i gruczołach jelitowych w porównaniu z poprzednią grupą doświadczalną.

III grupa doświadczalna (60 mg/kg — 1 godz.)

Analiza preparatów jelita cienkiego III grupy zwierząt doświadczalnych (ryc. 6) wykazała, że pilokarpina podana w dużych dawkach wywołuje hamujący wpływ na produkcję mukopolisacharydów. Przemawiają za tym słabsze odczyny na mukopolisacharydy obojętne i kwaśne w enterocytach, mukocytach i komórkach gruczołów jelitowych. Spotyka się mniejsze liczby mukocytów, średnio po 20 w jednym kosmku o jednakowym kształcie i przekroju. Poza tym mukocyty zmniejszyły swe rozmiary i kształt z okrągłego na bardziej wydłużony.

IV grupa doświadczalna (60 mg/kg — 2 godz.)

Zauważono wzrost odczynu na mukopolisacharydy kwaśne i obojętne w porównaniu z III grupą doświadczalną, lecz słabszy niż w komórkach nabłonka jelitowego i gruczołów I i II grupy (ryc. 7). Liczba komórek kubkowych obliczona w jednym kosmku zwiększała się w stosunku do liczby występującej w III grupie doświadczalnej. Częściej spotykano mukocyty o kształcie owalnym, jedynie w szczytowej części nabłonka komórki wykazywały kształt spłaszczony. Liczba wyrzucanej wydzieliny przez mukocyty powiększała się (ryc. 8).

WYNIKI BADAŃ I WNIOSKI

Jak wykazują nasze badania działanie pobudzające pilokarpiny na przywspółczulne zakończenia nerwowe jest przyczyną zwiększonego wydzielania śluzu przez mukocyty, powoduje zmiany w odczynach histochemicznych mukopolisacharydów kwaśnych i obojętnych w enterocytach, mukocytach i komórkach nabłonka gruczołów jelitowych. Pilokarpina podana jednorazowo w dawce 10 mg/kg po 1 godzinie wywołuje pobudzenie do wydzielania komórek śluzowych w jelicie cienkim. Występują one w różnych stadiach wydzielania. Najsilniejszy pobudzający wpływ pilokarpiny obserwowano po dwu godzinnym jej działaniu w dawce 10 mg/kg, gdzie znacznie wzrosła liczba mukocytów i wydzielanie

śluzu. Zauważone przez nas zmiany cytomorfologiczne i histochemiczne w komórkach nabłonka jelitowego mogą świadczyć o wzmożonej fazie wydzielniczej komórek śluzowych, co zgodne jest z badaniami Sokółowskiej-Hallio (12), z których wynika, że pilokarpina wykazuje mucynogenne działanie na śluzówkę dna żołądka szczura.

Jak wiemy, mukocyt stanowi samodzielną jednostkę gruczołową i wydzielanie śluzu przez te komórki jest okresowe (Kana, 1962, Szynikowa, 1967). Dlatego sądzi się, że zmiany w zachowaniu się mukopolisacharydów są wynikiem wpływu pilokarpiny na włókna spłotów nerwu współczulnego wpływającego bezpośrednio na błonę śluzową jelita cienkiego i jego gruczoły, na co wskazują badania Staszycy i Królikowskiej-Prasał (13), którzy uważają, że przecięcie nerwów błędnych wpływa na procesy anaboliczne i kataboliczne komórek nabłonka jelitowego i gruczołowego, a także Ptasińskiej-Krzysztofowicz (8), która stwierdza, że długotrwałe podawanie antrenylu poraża nerw błędny i wpływa hamująco na procesy resorpcyjne i wydzielnicze komórek nabłonkowych i gruczołowych jelita cienkiego.

Zwiększenie dawki pilokarpiny do 60 mg/kg wywołuje po 1 godzinie hamowanie czynności wydzielniczych w mukocytach, o czym świadczy zmniejszenie reakcji na mukopolisacharydy kwaśne i obojętne w mukocytach oraz zmniejszone ilości wytwarzanego śluzu. Przedłużenie działania tej samej dawki (60 mg/kg) do 2 godzin spowodowało ponowne pobudzenie mukocytów do produkcji śluzu. Liczba mukocytów zwiększyła się do liczby, jaką posiadała grupa kontrolna. Na przejściowy charakter zmian pod wpływem pilokarpiny w metabolizmie komórek nabłonka zwraca uwagę Scott (10), który badając działanie pilokarpiny na aktywność fosfatazy zasadowej w jelicie, nerce i gruczołach potowych u myszy stwierdził, że ilość enzymu malała, a maksymalny spadek obserwowano po 1 godzinie od chwili podania pilokarpiny, powrót zaś do wartości normalnych po 24 godzinach.

Zmiany w odczynach na mukopolisacharydy kwaśne i obojętne w komórkach nabłonka jelitowego pod działaniem pilokarpiny świadczą o zaburzeniu w metabolizmie enterocytów i mukocytów. Pilokarpina powoduje również zmiany w komórkach wydzielniczych gruczołów ślinowych, gdzie według badań Skalskiej-Vorbrodt (11) następuje przemieszczenie DNA na obwód jądra komórkowego oraz ubytek chromatyny przyjąderkowej, a Królikowska-Prasał (6) przeprowadzając oznaczenia ilościowe DNA i RNA w śliniance podszczękowej myszy stwierdziła zmniejszenie ilości kwasów nukleinowych w przypadku podawania zwierzętom pilokarpiny.

Na podstawie przeprowadzonych badań nad wpływem pilokarpiny na

odczyny histochemiczne mukopolisacharydów kwaśnych i obojętnych należy sądzić, że:

1. Jednorazowe dawki pilokarpiny (10 mg/kg) po 1 godzinie powodują wzrost intensywności odczynów na mukopolisacharydy w komórkach nabłonka i gruczołów jelitowych.

2. Przedłużenie czasu działania pilokarpiny w dawce 10 mg/kg do 2 godzin wywołuje najsilniejszy efekt pobudzający. Zwiększa się intensywność odczynów na śluzowielocukrowce oraz liczba mukocytów i wydzielanego przez nie śluzu.

3. Zwiększenie dawki do 60 mg/kg działającej w czasie 1 godziny hamuje procesy wydzielnicze mukocytów, na co wskazuje osłabienie odczynów na mukopolisacharydy kwaśne i obojętne.

4. Po 2 godzinnym działaniu pilokarpiny w dawce 60 mg/kg na nabłonek jelitowy liczba mukopolisacharydów i wydzielanie śluzu zwiększa się ponownie.

PIŚMIENNICTWO

1. Cooke H. J., Cooke A. R.: *Digestion* **1**, 209—212, 1968.
2. Dadlez J., Kubikowski P.: *Farmakologia i toksykologia leków*. PZWL, Warszawa 1965.
3. Grzycki S., Królikowska - Prasał I.: *Z. mikrosk.-anat. Forsch., Leipzig* **86**, 425—432, 1972.
4. Kanwar C. K.: *Cytologia* **27**, 233—247, 1962.
5. Kilkowska K., Kozłowska K.: *Folia Morph.* **30**, 21—32, 1971.
6. Królikowska - Prasał I.: *Annales Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, sec. D.* **17**, 349—356, 1962.
7. Marks I. N.: *Quart. J. Exp. Physiol.* **42**, 180—189, 1957.
8. Ptaszyńska - Krzysztofowicz I.: *Annales Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, sec. D.* **26**, 345—350, 1971.
9. Robberrecht P.: *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **79**, 846—847, 1971.
10. Scoot T. G.: *Exp. Cell Res.* **23**, 130—137, 1961.
11. Skalska - Vorbrodt J.: *Annales Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, sec. D.* **7**, 1—22, 1952.
12. Sokołowska - Halliop J.: *Annales Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, sec. D.* **25**, 97—125, 1970.
13. Staszyc J., Królikowska - Prasał I.: *Annales Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, sec. D.* **22**, 257—264, 1967.
14. Szubnikowa E. A.: *Citologija i Citofiziologia siekrietornogo processa*. Izdat. Moskowskogo Universiteta. Moskwa 1967.
15. Wołkowa A. D., Jakowlewa A. A.: *Nostnik Oftamol.* **3**, 63—65, 1971.
16. Zabłocka B., Esplin W.: *J. Pharm. exper. Therap.* **140**, 162—169, 1963.

Ctrzymano 6 II 1974.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Komórki śluzowe w jelicie cienkim szczura kontrolnego. Reakcja PAS. Pow. ok. 500 X.

Ryc. 2. Komórki śluzowe w jelicie cienkim szczura po 1 godzinie działania pilokarpiny w dawce 10 mg/kg. Reakcja PAS. Pow. ok. 500 X.

Ryc. 3. Mukocyty w jelicie cienkim szczura kontrolnego. Reakcja z błękitem alcjanowym wg Mowry. Pow. ok. 500 X.

Ryc. 4. Mukocyty w jelicie cienkim szczura po 1 godzinnym działaniu pilokarpiny w dawce 10 mg/kg. Reakcja z błękitem alcjanowym wg Mowry. Pow. ok. 500 X.

Ryc. 5. Komórki śluzowe w jelicie cienkim szczura po 2 godzinach działania pilokarpiny w dawce 10 mg/kg. Reakcja PAS. Pow. ok. 500 X.

Ryc. 6. Komórki śluzowe w jelicie cienkim szczura po 1-godzinnym działaniu pilokarpiny w dawce 60 mg/kg. Reakcja PAS. Pow. ok. 500 X.

Ryc. 7. Mukocyty w jelicie cienkim szczura po 2 godzinach działania pilokarpiny w dawce 60 mg/kg. Reakcja PAS. Pow. ok. 500 X.

Ryc. 8. Mukocyty w jelicie cienkim szczura po 2 godzinach działania pilokarpiny w dawce 60 mg/kg. Reakcja z błękitem alcjanowym wg Mowry. Pow. ok. 500 X.

РЕЗЮМЕ

Наблюдались гистохимические изменения в реакциях на нейтральные и кислые мукополисахариды в эпителиальных и железистых клетках кишки крыс после введения пилокарпина. Установлено, что пилокарпин повышает реакцию мукополисахаридов и повышает секреторную функцию мукоцитов. Самые большие изменения наблюдались при дозе 10 мг/кг, действующей в течение одного часа.

SUMMARY

Histochemical acid and neutral mucopolysaccharides reaction in the epithelial and glandular cells of small intestine of the rat were examined after the administration of pilocarpine. It was found that pilocarpine caused an increase in the mucopolysaccharides reaction and stimulated the mucocytes in the secretory function. Maximal changes were observed at a dose of 10 mg/kg which was effective for 1 hour.

EXPLANATIONS OF FIGURES

Fig. 1. Mucous cells in the small intestine of control rat. PAS reaction. Magn. ca 500 X.

Fig. 2. Mucous cells in the small intestine of a rat after one hour pilocarpine influence at a dose of 10 mg/kg. PAS reaction. Magn. ca 500 X.

Fig. 3. Mucocytes in the small intestine of control rat. Alcian blue reaction by Mowry. Magn. ca 500 X.

Fig. 4. Mucocytes in the small intestine of a rat after one hour pilocarpine in- at a dose of 10 mg/kg. Alcian blue reaction by Mowry. Magn. ca 500 X.

Fig. 5. Mucous cells in the small intestine of a rat after two hours pilocarpine influence at a dose of 10 mg/kg. Alcian blue reaction by Mowry. Magn. ca 500 X.

Fig. 6. Mucous cells in the small intestine of a rat after one hours of pilocarpine influence at a dose of 60 mg/kg. PAS reaction. Magn. ca 500 X.

Fig. 7. Mucocytes in the small intestine of a rat after two of pilocarpine influence at a dose of 60 mg/kg. PAS reaction. Magn. ca 500 X.

Fig. 8. Mucocytes in the small intestine of a rat after two hours of pilocarpine in- fluence at a dose of 60 mg/kg. Alcian blue reaction by Mowry. Magn. ca 500 X.



