

I Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych. Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. Janusz Hanzlik

Oddział Ginekologiczno-Położniczy Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego w Lublinie

Ordynator: prof. dr hab. Józef Daniłóś

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii z Pracownią Cytologii Doświadczalnej. Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. Irena Królikowska-Prasał

**Małgorzata STASZYC-ORZELSKA, Robert ORZELSKI,
Józef STASZYC**

**Badania cytoenzymatyczne wybranych struktur dwunastnicy szczura
po chirurgicznym usunięciu gonad**

Цитоферментативные исследования избранных структур двенадцатиперстной кишки
после хирургического удаления гонад

The Cytoenzymatic Studies of the Selected Rat Duodenum Structures
after Surgical Removal of the Gonads

Wyniki otrzymane po 10 dniach od obustronnej gonadektomii wskazywały na zmiany morfokinetyczne komórek nabłonka i gruczołów dwunastnicy (7). W obecnej publikacji przedstawiono analizy uzyskane po dłuższej obserwacji. Przyjęty model doświadczenia pozwolił na rozwinięcie się pełnych mechanizmów adaptacyjnych i eliminuje stresy operacyjny i pooperacyjny (3, 5, 9).

MATERIAŁ DOŚWIADCZALNY I METODYKA BADAŃ

Obserwacje przeprowadzono na 24 7-miesięcznych samcach szczurów białych szczepu Wistar, hodowli wsobnej, o c.c. ok. 240–250 g. Warunki bytowania zwierząt były podobne jak w pierwszej części doświadczenia (7). Zwierzęta podzielono na następujące grupy:

Grupa kontrolna (6 sztuk). W celu porównania zwierzęta tej grupy dekapitowano równocześnie z odpowiednimi doświadczalnymi, zawsze rano, przed karmieniem.

Grupa szczurów pozornie operowanych (6 sztuk). W znieczuleniu ogólnym wykonywano laparotomię. Zabieg ten, podobnie jak pobieranie materiału do badań, prowadzono jednocześnie jak u zwierząt doświadczalnych.

Grupa I doświadczalna (6 sztuk). W znieczuleniu ogólnym usuwano jądra z najądrzami (12). Dwunastnicę do badań pobrano w 3 miesiące po trzebieniu. Powikłań pooperacyjnych nie stwierdzono.

Grupa II doświadczalna (6 sztuk). Technika chirurgicznej gonadektomii jak w grupie I. W 6 miesięcy od zabiegu pobierano dwunastnicę. Przed dekapitacją zwierzęta ważono. Stwierdzono, że ciężar ciała, podobnie jak i w grupie I, w porównaniu ze szczurami grup kontrolnych nie uległ istotnym zmianom.

Dwunastnicę utrwalano w płynach Bakera, Carnoya, Gendre'a, a po odwodnieniu zatapiano w parafinie. Wykonano barwienia na kwas rybonukleinowy, mukopolisacharydy, tkankę łączną oraz ziarnistości diazo-dodatnie w komórkach enterochromafinowych serii GEP, przy użyciu barwnika: soli Fast Red B (Firmy Gurr, London-England). Do trawienia preparatów zastosowano diastazę i dimedon. Badania histoenzymatyczne na aktywność fosfatyz kwasnej i zasadowej oraz dehydrogenazy bursztynianowej prowadzono według metod Gomoriego i McManusa, na materiale nie utrwalonym (11).

BADANIA WŁASNE

Grupa kontrolna

Przeprowadzone analizy histologiczne i cytoenzymatyczne wykazały fizjologiczne obrazy struktur ściany dwunastnicy. Komórki enterochromafinowe — srebrochłonne lokalizowały się przeważnie na dnie krypt, choć spotykano również rozmieszczone i w kosmkach. Układały się one w skupiska oraz pojedynczo. Były kształtu wrzecionowatego i trójkątnego, z centralnie ułożonym jądrem i jąderkiem okrągłym lub owalnym. Ziarenka diazo-pozytywne wybarwione na kolor brązowo-czerwony lokalizowały się w całej cytoplazmie, przeważnie poza częścią przywierzchołkową. Ze względu na kształt, wielkość i rozmieszczenie ziarenek wyróżniono kilka typów tych komórek. Jedne ze średnio dużymi i licznymi ziarnami, drugie z drobnymi i nielicznymi. Trzeci typ reprezentowany był przez komórki z pyłowymi ziarnistościami, a czwarty, najmniej liczny, charakteryzował się obecnością pojedynczych konglomeratów-skupisk, różnie wybarwionych (ryc. 1).

Grupa szczurów pozornie operowanych

Zarówno po 3 jak i po 6 miesiącach od laparatomii nie stwierdzono zmian morfologicznych i cytoenzymatycznych w enterocytach, mukocytach, gruczołach dwunastniczych oraz komórkach enterochromafinowych. Również liczba tych komórek w polu widzenia nie uległa zmianie. Po 5 miesiącach od zabiegu padł jeden szczur. Sekcja nie wykazała związku z zabiegiem (ryc. 2).

Grupa I doświadczalna

U podstawy kosmków pomiędzy enterocytami częściej niż w preparatach ze zwierząt kontrolnych i pozornie operowanych obserwowano leukocyty. W pojedynczych przypadkach w zrębie kosmków zauważono nacieki komórek jedno-

jądrzastych. Komórki śluzowe gruczołów dwunastniczych miały jądra przeważnie spłaszczone i u podstawy, a w tych, gdzie było ono okrągłe, stwierdzono, że wartości stosunku jąderkowo-jądrowego uległy zaburzeniu na niekorzyść jąderka (ryc. 3). Pyroninochłonne ziarenka RNA rozrzucone były równomiernie po całej cytoplazmie. Indeks jądro-cytoplazmatyczny i jąderka enterocytów miały nie zmienione objętości. Mukocyty sporadycznie występowały w grupach po 2–4. PAS-dodatnie reakcje, występujące w nich i w komórkach gruczołowych błony podśluzowej, były silniejsze w mukocytach na kosmkach niż w kryptach. Struktury PAS-dodatnie odporne były na działanie diastazy, a po dimedonie dawały odczyny ujemne. Większość mukocytów miała szczyt przerwany, co świadczyło o wydzielaniu śluzu (ryc. 4). Odczyn na fosfatazę kwaśną w lizosomach enterocytów w postaci drobnych ziarnistości był mniej intensywny niż w materiale kontrolnym. Pozytywne reakcje na fosfatazę zasadową były obecne w rąbku oskórkowym, komórkach nabłonka jelitowego oraz w ścianach naczyń krwionośnych. Aktywność na ten enzym, podobnie jak na dehydrogenazę bursztynianową, była mniejsza w kryptach (ryc. 5). W większej liczbie komórek enterochromafinowych niż w materiale kontrolnym obserwowano zbijanie się ziarnistości diazo-dodatnich w grudki, i to duże, które leżały w polu przyjądrowym lub pod błoną komórkową w części przypodstawnej. W pojedynczych komórkach ziarnistości było mało i nie tworzyły one złożeń. Były to komórki „puste — cienie”, które gromadziły się częściej na kosmkach (ryc. 6).

Grupa II doświadczalna

Na szczycie części kosmków układ komórek resorpcyjnych — enterocytów był luźniejszy niż w odpowiednich grupach kontrolnych i u zwierząt doświadczalnych grupy I. U niektórych szczurów pojedyncze kosmki były obrzęknięte i skrócone. Enterocyty tych kosmków wskazywały na przyćmienie mięszone, a rąbek oskórkowy był zwężony. Liczba komórek wydzielniczych — mukocytów na powierzchni kosmków nie wykazywała istotnych różnic, ale wśród nich było mniej mukocytów z przerwanym szczytem. Jąderka wszystkich rodzajów komórek miały objętość i pyroninofilność prawidłowe. W kryptach jelitowych tak o przebiegu prostym jak i skośnym nie znaleziono licznych figur podziału kariokinetycznego. Nabłonek w nich był niższy, a rąbek oskórkowy prawie niewykształcony, o słabo zaznaczonej aktywności na badane enzymy. Reakcje enzymatyczne na enzymy w porównaniu z materiałem grup kontrolnych i grupy I doświadczalnej były wyraźnie mniej aktywne. Mukocyty dodatnich reakcji na fosfatazę kwaśną nie wykazywały, a odczyny PAS wskazywały na zmienność faz czynnościowych (ryc. 7). Podobnie jak w całym materiale i tutaj gruczoły dwunastnicze lokalizowały się w błonie podśluzowej i miały budowę cewkowo-pęcherzykową, często rozgałęzioną. Odcinki wydzielnicze zbudowane z komórek przyzmatycznych i wałcowatych wybarwione hematoksyliną i eozyną oraz

wg reakcji PAS dawały odczyny śluzowe. Nieliczne komórki wykazywały odczyn dyfuzyjny. Spłaszczone ich jądra układały się przeważnie u podstawy komórek. Zauważono, że w przewodach wyprowadzających występowały pojedyncze mukocyty. Odnosiło się wrażenie, że w porównaniu ze zwierzętami grup poprzednich liczba gruczołów w błonie podśluzowej była niższa. Wśród komórek enterochromafinowych wybarwiło się więcej komórek „cieni”, jak i z pojedynczymi ziarnami (ryc. 8), polaryzującymi się przeważnie u podstawy.

DYSKUSJA I WNIOSKI OGÓLNE

Gonady męskie są głównym źródłem androgenów (90–95%), a ich cykl metaboliczny działa w systemie równowagi wielohormonalnej sterowanej przez podwzgórze. Usuwając gonady wywołano gwałtowne ustanie dopływu tutaj syntetyzowanych hormonów, co zaburzyło regulację całego środowiska wewnętrznego organizmu poprzez oś podwzgórzowo-przysadkowo-gonadową. Funkcję usuniętych gonad w syntezie androgenów podjęły nadnercza z efektami tropowym i trofowym, a przysadka wzmogła syntezę gonadotropin, jednak jako „gruczoł etapu” znalazła się pod przemożnym wpływem działania liberyn i statyn, syntetyzowanych w komórkach podwzgórza. Prowadzić to może do zmian metabolizmu somatotropiny, a następnie somatostatyny z jej wpływem na sekrecję gastryny i produkcję kwasu solnego, oraz depresyjnego działania na wydzielanie sekretyny w dwunastnicy.

Obserwowane obniżenie aktywności enzymów wskazuje na zmiany w metabolizmie gruczołów dwunastniczych i mukocytów, które podlegają modyfikującemu działaniu przysadki, tarczycy, nadnerczy i układu nerwowego (8). Potwierdzeniem zaburzenia działania osłaniającego i działania cytoprotekcyjnego są też obniżone odczyny na mukopolisacharydy, co wskazuje na zmiany w wydzielaniu ACTH przez przysadkę i glikoproteidów przez korę nadnerczy (1). Zmniejszenie się wielkości ziarenek specyficznych w komórkach enterochromafinowych i wzrost liczby komórek „pustych” potwierdza udział w tych procesach somatostatyny, neuroprzekaźnika układu podwzgórzowo-przysadkowego, który zadziałał w dwunastnicy jako neurohormon hipofizjotropowy (10).

W grupie I doświadczalnej wartości stosunku jąderkowo-jądrowego w komórkach gruczołowych dwunastnicy były różne, co może świadczyć o zmianie syntezy r-RNA i prerybosomów lub o zaburzeniu ich przechodzenia do cytoplazmy, co ma wpływ na produkcję białek strukturalnych i enzymatycznych (2, 6). Obniżenie reakcji Fk wskazuje na zmniejszone zapotrzebowanie na hydrolazy w komórkach wydzielających i na zmiany mikrometabolizmu w rąbku oskórkowym jak i zaangażowanych organellach, a przede wszystkim w lizosomach, biorących udział w procesach wewnątrzkomórkowego trawienia. W porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi, u kastrowanych aktywność na Fz

w rąbku oskórkowym w obrębie krypt oraz na powierzchni kosmków była podobna, co dowodzi, że komórki nabłonka, przesuując się ze strefy odnowy do szczytu kosmka, nie osiągają kompletu enzymów i przenośników, nieod-zownych przy wydzielaniu i wchłanianiu jelitowym. Przyjmując tę hipotezę zakładamy, że Fz stanowi element składowy rąbka, a nie jest przez niego wtórnie adsorbowana z soków jelitowych na jego powierzchni. Jeżeli jest to słuszne, to obrazy enzymatyczne mogą wskazywać na zaburzenia trawienia kontak-towego.

Materiał do badań pobierano ze zwierząt, które żyły 10 i 13 miesięcy. Jedne z trzebionych szczurów miały na adaptację 3 (grupa I), a pozostałe 6 miesięcy (grupa II). Ustalenie związku przyczynowego pomiędzy zmianami wynikłymi z powodu fizjologicznego starzenia się — przekwitania a szkodliwym działaniem gonadektomii jest trudne i płynne, ponieważ skutki trzebienia, jak każdy bodziec stresowy, zachodzą na drodze: receptor obwodowy—twór siatkowaty—układ limbiczny—podwzgórze—przysadka mózgowa—nadnercza i mają działanie nagłe, a starzenie się daje czas na powolną adaptację (4), co, być może, miało miej-sce w grupie II. Gawlik i wsp. (3), Huber (4) i inni stwierdzili obniżenie przemiany materii po trzebieniu, co w naszym eksperymencie, być może, miało związek ze zmienionymi odczynami histoenzymatycznymi w rąbku oskórkowym i gruczołach, gdyż, jak wiadomo, prowadzą one do nieprawi-dłowej wymiany substancji pomiędzy dwunastnicą a organizmem jako całością.

Wyniki uzyskane w naszych badaniach poprzednich i aktualnych wskazują, że z założonych modeli doświadczalnych i zastosowanych metod badawczych nie można jednoznacznie wnioskować, że zmiany te są wyrazem tylko bez-pośredniego wpływu trzebienia, które doprowadziło do nagłego braku hor-monów syntetyzowanych w gonadach, czy też jest to wpływ pośredni i stanowi wyraz adaptacji szczura do zmienionych warunków środowiska wewnętrznego.

PIŚMIENNICTWO

1. Czewżyk T., Kitowska-Chadzypanagiotis K.: Reactions of Arylsulphatase and β -Glucoronidase in the Intestinal Epithelium in Rats under Conditions of Changed ACTH and Steroid Hormones Level. *Folia Morphol.* **44** (2), 108, 1985.
2. Edemsky A., Svishchev A.V.: Anato-mo-stereological Characteristics of the Mucous Membrane of the Major Duodenal Papilla. *Archiw. Anatomii, Gistologii i Embriologii* **3**, 61, 1986.
3. Gawlik Z., Nützenadel W., Krawczyk M., Wiśniewska I. E.: The Effect of Junoec-tomy on Alkaline Phosphatase Activity in the Ileum. *Folia Histochem. et Cytobiol.* **23** (3), 144, 1985.
4. Huber G.: Treatment of Gastro-intestinal Complaints Accompanying Menopause with Motilium Film-coated Tablet. *Terapia Hungarica* **35** (4), 227, 1987.
5. Matsuzaki H., Yamada J., Krauze W., Kitamura N., Yamashita T.: On Ultrastrural and Immunocytochemical Study of Endocrine Cells the Proximal Duodenum of the Echidina (*Tachyglossus aculeatus*). *Z. mikrosk.-anat. Forsch. (Leipzig)* **99** (5), 793, 1985.

6. Novikova A. L.: Microcirculatory Bed of the Human Duodenum. *Archiw. Anatomii, Gistologii i Embriologii* **12**, 55, 1985.
7. Orzelski R., Staszyc-Orzelska M., Dyrka A., Staszyc J.: Badania wpływu gonadektomii na odczyn komórek nabłonka dwunastnicy szczura białego. *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* **40**, 1985.
8. Puzyrev A. A., Ivanova V. F.: Mixed Glandulocytes of the Duodenalepithelium in Some Vertebrata and in the Man. *Archiw. Anatomii, Gistologii i Embriologii* **4**, 48, 1985.
9. Tarsoly E., Zehner M., Lukačs P.: Effect of the Castration on the Epiphyseal Cartilage of Young Male Rats. *Z. mikrosk.-anat. Forsch. (Leipzig)* **99** (6), 897, 1985.
10. Uselilini L., Capelle C., Malesci A., Rindi G., Solcia E.: Ultrastructural Lokalization of Cholesystokinin in Endocrine Cells of the Dog Duodenum by the Immunogoldtechniques. *Histochemistry* **83**, 331, 1985.
11. Zawistowski S.: Technika histologiczna. PZWŁ, Warszawa 1983.
12. Żakiewicz M.: Chirurgia małych zwierząt. PWRiL, Warszawa 1984.

Otrzymano 1988.07.02.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Grupa kontrolna. Dwunastnica. Komórki enterochromafinowe. Barwienie przy użyciu soli Fast Red B. Pow. ok. 400 ×.

Ryc. 2. Grupa szczurów pozornie operowanych. Fragment ściany dwunastnicy. Barwienie według metody Massona. Pow. ok. 400 ×.

Ryc. 3. Grupa I doświadczalna. Uwidocznione jądra i jąderka. Barwienie H + E. Pow. ok. 450 ×.

Ryc. 4. Grupa I doświadczalna. Mukocyty na powierzchni kosmków jelitowych. Barwienie według metody McManusa. Pow. ok. 400 ×.

Ryc. 5. Grupa I doświadczalna. Odczyn na Fz według metody Gomoriego. Pow. ok. 600 ×.

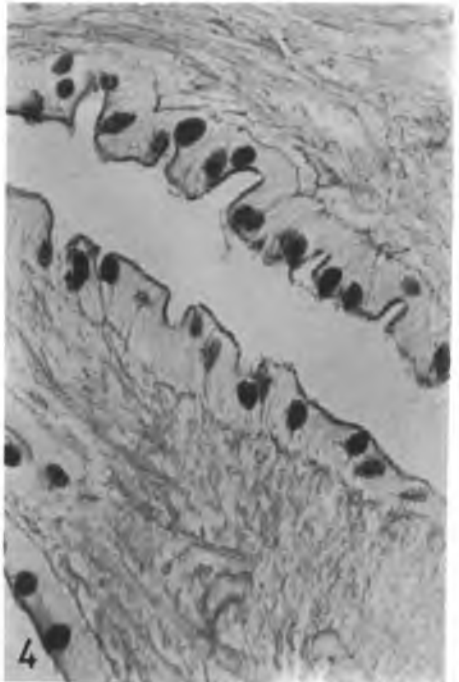
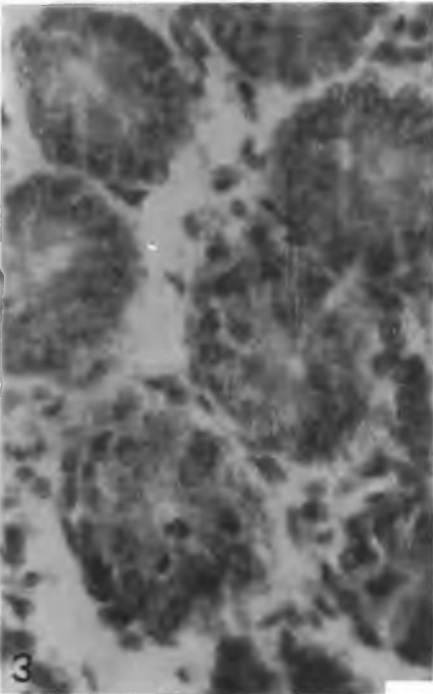
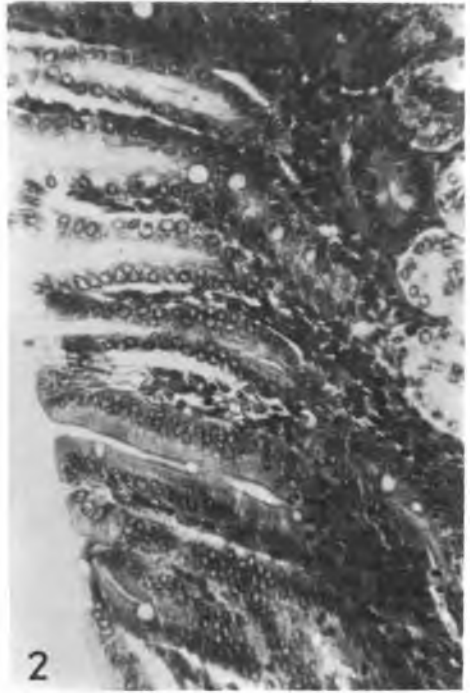
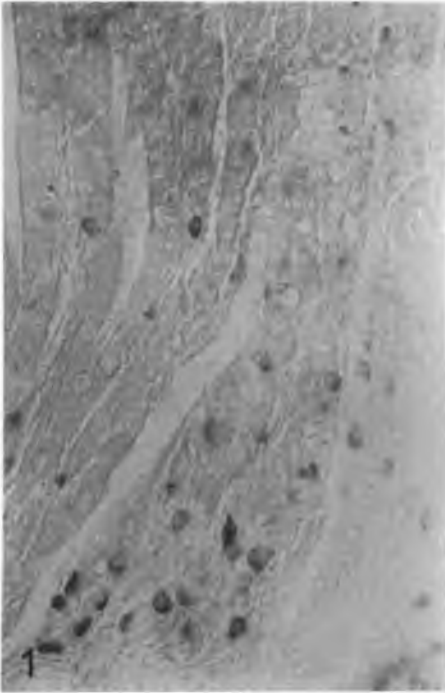
Ryc. 6. Grupa I doświadczalna. Ziarnistości diazo-pozytywne w komórkach enterochromafinowych. Barwienie przy użyciu soli Fast Red B. Pow. ok. 1000 × — immer.

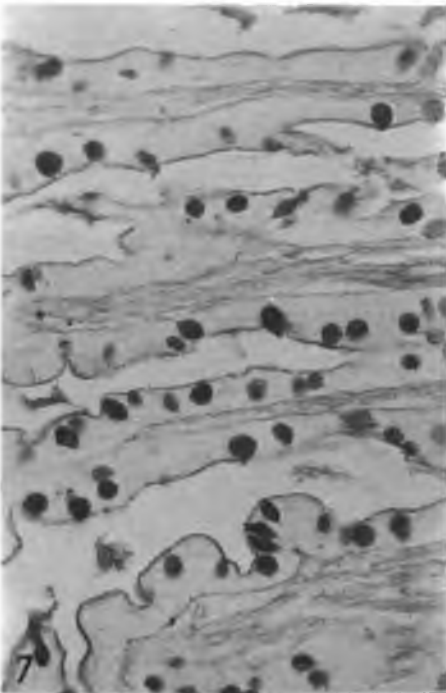
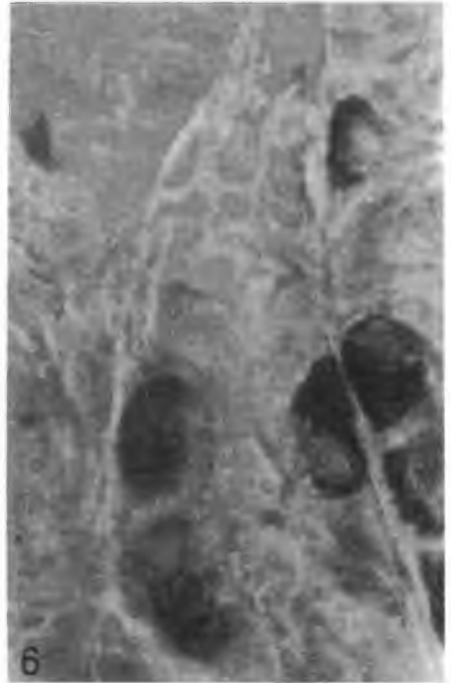
Ryc. 7. Grupa II doświadczalna. Różne rytmy czynności gruczołowej komórek śluzowych. Barwienie według metody McManusa. Pow. ok. 400 ×.

Ryc. 8. Grupa II doświadczalna. Widoczne komórki „puste” i „cienie” z serii GEP. Barwienie przy użyciu soli Fast Red B. Pow. ok. 1000 × — immer.

РЕЗЮМЕ

Хирургически устрaнено белым крысам яички (семенные железы) и спустя 3 и 6 месяцев после гонадeктомии исследовано двенадцатиперстную кишку на РНК, мукополисахариды, кислые и щелочные фосфатазы, янтарные дегидрогеназы, диаположительные грануляции в клетках GEP, а также соединительные ткани. По сравнению с материалом контрольной и ложно-оперированной групп обнаружены изменения в реакциях, свидетельствующие о влиянии синтезированных андрогенов на морфологию и физиологию двенадцатиперстной кишки.





SUMMARY

The authors surgically removed the gonads from the white rats and 3 and 6 months later performed the examination of the duodenum for RNA, mucopolysaccharides, the activity of the acid and the alkaline phosphatase, succinic dehydrogenase, the diazopositive granules in GEP cells and the connective tissue. In comparison with the control and the sham operated groups, the changes in the reactions were found out. This may be the evidence of the influence of the synthesized androgens in testes on the duodenal morphology and physiology.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Control group. Duodenum. Enterochromaffin cells. Staining with Fast Red B salt. Magn. ca 400 ×.

Fig. 2. Sham operated group. Part of the duodenal wall. Staining according to Masson. Magn. ca 400 ×.

Fig. 3. Experimental group. Visible testes and nucleoli. Staining H + E. Magn. ca 450 ×.

Fig. 4. Experimental group. Mucocytes on the surface of the intestinal villi. Staining according to McManus. Magn. ca 400 ×.

Fig. 5. Experimental group I. Fz reaction according to Gomori. Magn. ca 600 ×.

Fig. 6. Experimental group I. Diazopositive granules in enterochromaffin cells. Staining with Fast Red B salt. Magn. ca 1000 × — immer.

Fig. 7. Experimental group II. Different rhythms of the glandular activity of mucous cells. Staining according to McManus. Magn. ca 400 ×.

Fig. 8. Experimental group II. Visible "empty" cells and "shadows" from GEP series. Staining with Fast Red B salt. Magn. ca 1000 × — immer.

