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

Jan KUDEJKO

**Badania histotopochemiczne skóry królików przed i po podaniu
cholesterolu i glukonianu wapnia**

**Гистотопохимические исследования кожи кроликов до и после подачи
холестерола и кальция**

**The Histotopochemical Examination of the Rabbit Skin before and after
Administration of Cholesterol and Calcium Gluconate**

Doświadczenie przeprowadzono na 6 królikach albinosach (4 samice i 2 samce nr 6 i 7), wagi od 1,87 do 2,18 kg. Króliki nr 4 i 6 otrzymywały cholesterol i glukonian wapnia, nr 7 cholesterol, nr 3 i 5 glukonian wapnia. Królik nr 8 stanowił kontrolę. Króliki nr 1 i 2 padły w czasie doświadczenia z przyczyn bliżej nie określonych. Cholesterol i glukonian wapnia w ilości po 1 g podawano doustnie w czasie wydechu; początkowo przez pierwszy miesiąc rozpuszczając te związki w oleju rzepakowym, przez następne 2 miesiące podawano te składniki bez oleju, zwilżając je wodą destylowaną. Do badań pobierano kawałeczki uszu przed rozpoczęciem doświadczenia oraz po upływie 1,5 i 3 miesięcy karmienia cholesterolom i glukonianem wapnia. Oprócz tego badano skrawki aorty uzyskane z materiału sekcyjnego, a także określano poziom cholesterolu i wapnia w surowicy krwi. Z wycinków utrwalonych w płynie Bouina sporządzono skrawki parafinowe grubości 7 μ , które następnie barwiono hematoksyliną i eozyną, rezorcyną i fuksyną na włókna sprężyste oraz na wapno wg metody von Kossa podanej przez Pearsa. Wycinki utrwalone w obojętnej formalinie cięto na mikrotomie mroźniowym. Otrzymane skrawki grubości około 10 μ barwiono hematoksyliną i eozyną, badano na wapń wg metody von Kossa podanej przez Bagińskiego. Wolny cholesterol i jego estry wykrywano za pomocą obserwacji w świetle spolaryzowanym i wg metody podanej przez Feigina.

BADANIA WŁASNE

A. Obraz histotopochemiczny skóry królików przed rozpoczęciem podawania cholesterolu i glukonianu wapnia

Naskórek utworzony był z 3—4 warstw komórek. Grubość warstwy rogowej wahała się od 3 do 10 μ . Naczynia krwionośne były długie i szerokie, wypełnione dużą ilością krwinek czerwonych. Spostrzegano się liczne mieszki włosowe i gruczoły łojowe. Włókna kolagenowe zazwyczaj przebiegały równolegle po powierzchni skóry w postaci wąskich pęczków. Pojedynczo, luźno ułożone włókna kolagenowe spotykało się głębiej w pobliżu tkanki chrzęstnej. Zwracało uwagę występowanie dużej ilości fibroblastów oraz miejscami obecność nacieków złożonych z limfocytów, leukocytów i histiocytów. Włókien sprężystych w skórze właściwej było mało. Otaczały one po kilka lub kilkanaście mieszków włosowych. W głębszych warstwach skóry właściwej, szczególnie w pobliżu tętniczek widoczne były skupienia licznych krótkich i delikatnych włókienek. Długie nici włókienek otaczały niektóre naczynia krwionośne.

W świetle spolaryzowanym podwójnie załamywała światło warstwa rogowa, włókna kolagenowe, korzenie włosa oraz wydzielina łojowa. Większa część gruczołów łojowych nie zawierała kryształków anizotropowych. Za pomocą metody von Kossa stwierdzało się u badanych królików przed podaniem cholesterolu i wapnia zabarwienie brązowobrunatne lub czarne warstwy rogowej i korzeni włosów. Poza tym brak było wapnia w naskórku i w skórze właściwej. Badając obecność estrów cholesterolu wg metody Feigina otrzymano słabą barwliwość komórek naskórka. Wyraźny, dodatni odczyn histochemiczny obserwowano w mieszkach włosowych i w gruczołach łojowych oraz w wydzielinie gruczołów łojowych. W niektórych preparatach w warstwie rogowej, jako też w komórkach tkanki chrzęstnej występowały grudki barwiące się na ciemnofioletowo lub niebiesko. Jądra komórkowe naskórka, mieszków włosowych i gruczołów łojowych barwiły się mocniej. Stwierdzono, że wolny cholesterol występował w naskórku, w mieszkach włosowych, gruczołach łojowych i w komórkach tkanki chrzęstnej.

B. Wyniki badań skóry królików po podaniu glukonianu wapnia

W porównaniu ze skrawkami pobranymi przed podawaniem glukonianu wapnia grubość warstwy rogowej była mniejsza, włókna kolagenowe bardziej zbite i ułożone w grubsze pasma. Wyglądem swym obecnie bardziej przypominały włókna w skórze właściwej u ludzi.

Włókna sprężyste nie wykazywały wyraźnych różnic, były one trochę grubsze i występowały w nieco większej ilości. Za pomocą badań w świetle spolaryzowanym stwierdzono wzmożoną czynność wydzielniczą gruczołów łojowych. Świadczyła o tym większa ilość gruczołów łojowych, zawierających kryształki anizotropowe. Kryształki podwójnie załamujące światło występowały także w świetle rozszerzonych naczyń krwionośnych oraz w komórkach tkanki chrzęstnej. W skrawkach digitoninowych wypłukanych eterem i alkoholem kryształki świadczące o obecności wolnego cholesterolu widoczne były w komórkach tkanki chrzęstnej, w świetle naczyń krwionośnych i w gruczołach łojowych. Dodatni odczyn histochemiczny stwierdzono w gruczołach łojowych i mieszkach włosa. Zwracało uwagę słabe zabarwienie lub jego brak w naskórku. W skrawkach badanych na obecność wolnego cholesterolu odczyn histochemiczny był ujemny lub słabo dodatni w gruczołach łojowych i mieszkach włosowych.

Ziarenka wapnia spostrzegano się w świetle naczyń i ich ściankach (ryc. 1). Wyraźnie czarną lub brązowobrunatną barwę przyjmowały korzenie włosa. Drobne, czarne ziarenka występowały także w skrawkach kontrolnych w świetle naczyń i ich ściankach. Obecność ich należałoby raczej tłumaczyć tym, że przy dużej ilości w organizmie oraz w wymienionym środowisku wapń wchodził w połączenie powodujące uwidocznianie się jego w skrawkach nie barwionych.

C. Wyniki badań skóry królików po podaniu cholesterolu

W skrawkach pobranych u królików (nr 7) po 3-miesięcznym karmieniu cholesterolem w skórze właściwej stwierdzono mniejszą ilość fibroblastów, obecność grubszych pasm włókien kolagenowych, mniejszą ilość gruczołów łojowych i mieszków włosowych, zwiększoną zaś wielkość niektórych z nich. Włókien sprężystych było mniej. Grubość warstwy rogowej nie wykazywała wyraźnych różnic. W świetle spolaryzowanym spostrzegano dużo gruczołów łojowych, wypełnionych kryształkami podwójnie załamującymi światło. Duża ilość kryształków występowała pomiędzy włóknami tkanki łącznej, oraz w komórkach tkanki chrzęstnej. Obecność estrów cholesterolu potwierdziły badania histochemiczne. Odczyn dodatni Feigina, świadczący o istnieniu wolnego cholesterolu wykazywały mieszki włosa, gruczoły łojowe oraz krew w niektórych naczyniach.

Według metody von Kossa wykrywało się ziarenka wapnia w korzeniach włosa, które poza tym przyjmowały barwę brązowobrunatną

lub czarną. Drobne ziarenka wapnia widoczne były także w świetle naczyń pomiędzy krwinkami.

Dzięki uprzejmości dr Górskiego, który przeprowadzał badania nad wpływem kortikosteroidów na miążdżycę u królików szarych uzyskano dodatkowe do naszych badań skrawki uszu od 8 królików, którym poprzednio podawano cholesterol przez 3 miesiące. Otrzymane wyniki w zasadzie pokrywały się z wynikami podanymi wyżej. Obserwując zmiany w skórze wywołane podawaniem cholesterolu na większym materiale, zauważono wielokrotnie obecność dużych czopów rogowych, tworzenie się torbieli, zanikanie mieszków włosa i gruczołów łojowych (ryc. 2, 3, 4). Dookoła niektórych, zanikających mieszków włosowych i gruczołów łojowych widoczne były drobne nacieki limfocytarne oraz gromadzenie się włókien sprężystych. Zmiany te przypominały obrazy spotykane w skrawkach skóry, pobranych u osób w wieku od 55 do 80 lat.

W świetle spolaryzowanym spostrzegano duże różnice osobnicze w rozmieszczeniu i ilości kryształków podwójnie załamujących światło. Niekiedy stwierdzało się bardzo dużą ich ilość pomiędzy włóknami tkanki łącznej, niekiedy było ich w tych miejscach mniej lub tylko nieznaczna ilość (ryc. 5). Dużo grudek anizotropowych występowało we krwi w świetle naczyń, w gruczołach łojowych i komórkach tkanki chrzęstnej. Dużo kryształków wolnego cholesterolu zauważono w gruczołach łojowych, tkance chrzęstnej oraz pomiędzy włóknami tkanki łącznej (ryc. 6).

Według metody Feigina stwierdzono występowanie grudek barwiących się ciemnofioletowo lub niebiesko pomiędzy włóknkami tkanki łącznej oraz barwienie się na ciemnofioletowo naczyń tętniczych i żylnych (ryc. 7). Odczyn histochemiczny w skrawkach badanych na obecność wolnego cholesterolu był dodatni w naskórku, w niektórych ściankach naczyń krwionośnych zarówno tętniczych jak i żylnych, w świetle naczyń, w komórkach chrząstki, mieszków włosowych i gruczołów łojowych.

Przy badaniu skrawków barwionych wg metody von Kossa zwracała uwagę obecność wapnia u królików nie tylko w korzeniach włosa, a także we wszystkich warstwach naskórka. Największą ilość wapnia zawierała warstwa podstawna. Ziarenka wapnia układały się podobnie jak w skórze ludzkiej, głównie nad górnym biegunem jąder.

D. Wyniki badań u królików po podaniu cholesterolu i glukonianu wapnia

Ilość fibroblastów w skórze właściwej była mała. Gruczoły łojowe i mieszki włosa nie wykazywały wyraźnych różnic w porównaniu ze skrawkami badanymi przed podaniem cholesterolu i glukonianu wapnia.

W podścielisku widoczny był miejscami znacznego stopnia obrzęk, u królika nr 6 dość duże nacieki złożone z limfocytów i histiocytów. Włókna sprężyste miały bardziej nieregularny przebieg, były nieco grubsze i pofragmentowane. Ziarenka wapnia spostrzegano w świetle naczyń w ich ściankach oraz w korzeniach włosa. W świetle spolaryzowanym u jednego z królików (nr 6) była obecna duża ilość kryształków anizotropowych pomiędzy włóknami tkanki łącznej i w gruczołach łojowych, u drugiego (nr 4) spotykano niewiele kryształków pozakomórkowo, mniej też ich zawierały gruczoły łojowe. U obu królików w skrawkach digitoninowych występowały liczne grudki anizotropowe w tkance chrzęstnej oraz w pobliżu jej często w postaci krzyża maltańskiego. Podobny obraz otrzymano w skrawkach digitoninowych po wypłukaniu estrów cholesterolu, z tym wyjątkiem, że ilość grudek anizotropowych była mniejsza. Mało wolnego cholesterolu zawierała wydzielina gruczołów łojowych, brak było jego w świetle naczyń. Przy badaniu histochemicznym zwracało uwagę wyraźne występowanie dodatniego odczynu w świetle naczyń krwionośnych żylnych i tętnicznych oraz w ściankach tętniczek. Drobne, ciemnofioletowe grudki spostrzegało się także w tkance łącznej w pobliżu gruczołów łojowych, wewnątrz ich oraz w komórkach tkanki chrzęstnej. W skrawkach badanych na obecność wolnego cholesterolu słabo dodatni odczyn obserwowano w naskórku w niektórych gruczołach łojowych i mieszkach włosowych oraz w świetle pojedynczych naczyń krwionośnych.

E. Wyniki badania kontrolnego

Wyniki kontrolne uzyskano od królika (nr 8), który był karmiony tak samo jak pozostałe zwierzęta, lecz nie otrzymywał wapnia i cholesterolu. Przy porównaniu skrawków badanych 3 miesiące wstecz stwierdzono zmiany we włóknach sprężystych, które polegały na ich nieznacznym zgrubieniu i pofragmentowaniu. Zaobserwowano zmniejszenie się ilości fibroblastów, zgrubienie pęczków włókien tkanki łącznej, miejscami zaś obecność obrzęku pomiędzy włóknami tkanki łącznej.

F. Wyniki badań serologicznych

Badanie serologiczne z przyczyn technicznych wykonano nie u wszystkich zwierząt. Poziom cholesterolu u królika (nr 3) karmionego przez 3 miesiące glukonianem wapnia (całkowity — 250,1 mg %, estry — 201,5 mg %, wolny — 48,6 mg %), u królika (nr 4), któremu podawano przez ten sam okres cholesterol i wapń (całkowity — 1571,4 mg %, estry — 1377,0 mg %, wolny — 194,4 mg %) i u królika (nr 7), który

otrzymywał sam cholesterol (całkowity 1539,0 mg %, estry — 891,0, wolny 648,0), a także u królika kontrolnego (całkowity — 229,4 mg %, estry — 142,6, wolny 86,8 mg %) przedstawia wykres 1. Poziom wapnia w surowicy krwi u królika, który otrzymywał wapń (nr 8) wynosił 14,1 mg %, cholesterol i wapń (nr 4) — 13,0 mg %, cholesterol (nr 7) — 13,0 mg %, u kontrolnego zaś (nr 8) — 12,5 mg %.

Bardzo wysoki poziom cholesterolu całkowitego w surowicy krwi występował u królika karmionego cholesterolem oraz cholesterolem i wapniem. U królika, któremu podawano wapń poziom cholesterolu był wyższy od poziomu uzyskanego od królika kontrolnego. Zwrócił uwagę bardzo wysoki poziom estrów cholesterolu u królików karmionych glukonianem wapnia oraz cholesterolem i glukonianem wapnia (81% i 88%).

G. Wyniki badań histochemicznych tętnicy głównej królików po podaniu cholesterolu i wapnia

Wygląd makroskopowy tętnic głównych u królików karmionych wapniem (nr 3), cholesterolem (nr 7), cholesterolem i wapniem (nr 4) przedstawia ryc. 8. Najbardziej wyraźne zmiany miażdżycowe dotyczyły tętnicy głównej królika karmionego cholesterolem. Przedstawiały się one w postaci grubych białawych złożeń umiejscowionych w pobliżu zastawek oraz dookoła otworów odchodzących w tym miejscu drobnych naczyń tętnicznych. Złogi przy otworach miały kształt zbliżony do profilu skrzydeł w samolotach, które były skierowane w kierunku napływającej krwi. Zmiany miażdżycowe w tętnicy głównej królika (nr 4), któremu podawano cholesterol i wapń były znacznie mniejsze, bardziej płaskie, słabiej też zaznaczone przy ujściach drobnych tętniczek. U drugiego królika (nr 6), który także otrzymywał cholesterol i wapń, proces miażdżycowy był jeszcze mniej wyraźny. Ściany tętnic głównych u królików (nr 3 i 5) karmionych wapniem i u królika kontrolnego (nr 8) nie wykazywały zmian patologicznych, powierzchnia ich była gładka i różowa.

Badania histochemiczne i w świetle spolaryzowanym przeprowadzone u królików, którym podawano wapń i u królika kontrolnego nie wykazało w żadnej z warstw tętnic obecności cholesterolu i jego estrów. U królika karmionego cholesterolem w grudkach miażdżycowych obecne były liczne kryształki podwójnie załamujące światło. Grubość grudek miażdżycowych dochodziła nieraz do 40μ i przekraczała grubość tętnicy (30μ) (ryc. 9). W skrawkach digitoninowych po wypłukaniu estrów cholesterolu kryształki wolnego cholesterolu występowały w małych

ilościach w grudkach świeżych, w starszych zaś było ich znacznie więcej (ryc. 10). Obecność estrów i wolnego cholesterolu w grudkach miążdżycowych potwierdziły badania histochemiczne (ryc. 11, 12). U jednego z królików (nr 6) karmionych cholesterolem i wapniem jednocześnie, ilość drobnych grudek miążdżycowych była mała, u drugiego (nr 4) złogi miążdżycowe spotykało się dość często, jednak były one bardziej płaskie od spotykanych u królika, któremu podawano tylko cholesterol (ryc. 13). Na uwagę jednak zasługuje brak w grudkach złogowych badanych w świetle spolaryzowanym kryształków wolnego cholesterolu, lub ich znikoma ilość u królików karmionych cholesterolem i wapniem (ryc. 14). Za tym, że w zlogach tych znajdowały się prawie wyłącznie estry cholesterolu, przemawiały także badania histochemiczne. U królików karmionych tylko cholesterolem, jako też cholesterolem i wapniem w skrawkach barwionych wg metody von Kossa, hematoksyliną i eozyną i na włókna sprężyste stwierdzono, że grudki miążdżycowe zawierały gęstą sieć delikatnych włókien sprężystych, liczne komórki piankowate, nie zawierały zaś ziarenek wapnia. Wyników badań po półtoramiesięcznym wprowadzeniu królikom cholesterolu i wapnia nie podano, ponieważ były one pośrednie i nie wnosiły większych wartości do poruszanych zagadnień.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Obserwując preparaty barwione hematoksyliną i eozyną oraz rezorcyną i fuksyną, zauważono po upływie 3 miesięcy zmiany w skórze u królików doświadczalnych, które polegały na zmniejszeniu się ilości fibroblastów, pojawieniu się ognisk obrzękowych, zwiększaniu się spoiistości włókien kolagenowych, na pofragmentowaniu i nieznacznym zgrubieniu włókien sprężystych. Wymienione objawy występowały także u królika kontrolnego, z tego względu nie należałoby ich łączyć z podawaniem cholesterolu i wapnia.

W skrawkach skóry królików, którym podawano wapń, zwracała uwagę obecność ziarenek wapnia w świetle naczyń i w ich ściankach, wzmożenie czynności wydzielniczej gruczołów łojowych, obecność kryształków anizotropowych w świetle naczyń oraz w komórkach tkanki chrzęstnej. Spostrzeżenia te potwierdzają badania Grzyckiego (3), który stwierdził u chorych, którym podawał wapń wzrost cholesterolu we krwi i w naskórku oraz Chorążaka (1), który podawał, że w grupie chorych z nieprawidłowym rogowaceniem wysoki poziom wapnia odpowiadał wysokiemu poziomowi cholesteryny i na odwrót. Doświadczenie nasze zostało przeprowadzone na królikach białych, u których według metody von Kossa nie wykrywa się obecności wapnia w naskórku. Odczyn histo-

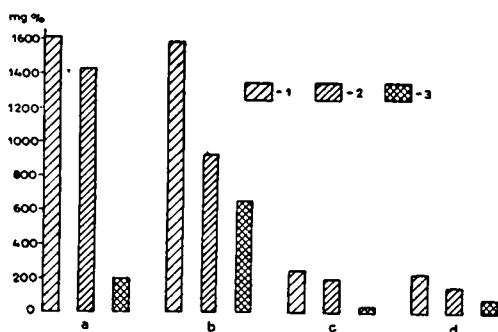
chemiczny w naskórku u nich wypadł słabo dodatnio, co według nas nie osłabia, lecz potwierdza obserwacje poczynione przez Grzyckiego i Chorążaka. Z badań naszych wynika, że rolę magazynowania cholesterolu u królików przy wzroście wapnia we krwi przyjmują gruczoły łojowe i komórki tkanki chrzęstnej.

U królików, którym podawano cholesterol widoczne były mniej lub bardzo liczne kryształki podwójnie załamujące światło pomiędzy włóknami tkanki łącznej. Większość gruczołów wykazywała niezwykle wzmożoną czynność wydzielniczą, dużo kryształków zawierały komórki tkanki chrzęstnej oraz wnętrza naczyń krwionośnych. W świetle naczyń pomiędzy krwinkami obecne były drobne ziarenka wapnia, czego nie obserwowano u królika (nr 7) przed rozpoczęciem karmienia cholesterolem oraz u królika kontrolnego przy badaniu sekcyjnym, a co także przemawiałoby za współzależnością pomiędzy cholesterolem i wapniem. Badając zachowanie się gruczołów łojowych i mieszków włosa, zauważono w skórze królików po podaniu cholesterolu zmiany spotykane u ludzi w wieku starszym, mianowicie: tworzenie się dużych czopów rogowych, obecność torbieli, zanikanie mieszków włosa i gruczołów łojowych. U pozostałych królików doświadczalnych jak i u królika kontrolnego nie stwierdzono wyraźnie zaznaczonych i często występujących zmian.

W poprzedniej pracy (4) wysunięto przypuszczenie, że powstawanie czopów rogowych może być spowodowane działaniem czynników szkodliwych, które omijają barierę naskórkową i poprzez mieszki włosowe i gruczoły łojowe z łatwością przedostają się do skóry właściwej i powodują przewlekły stan zapalny. Przeprowadzone doświadczenie na zwierzętach rzuca jeszcze inne światło na tę sprawę. Można sądzić, że jednym z czynników przy wzmożonym rogowaceniu jest obecność w nadmiarze wolnego cholesterolu, który w dowolnej ilości może być estryfikowany.

U królików, którym podawano wapń i cholesterol spostrzegano małą ilość kryształków anizotropowych pomiędzy włóknami tkanki łącznej i w gruczołach łojowych, bardzo dużą ich ilość w komórkach tkanki chrzęstnej. Odczyn histochemiczny Feigina na obecność wolnego cholesterolu był słabo dodatni tak w naskórku, jak i w przydatkach skóry właściwej. Badanie w świetle spolaryzowanym wykazało małą ilość wolnego cholesterolu w gruczołach łojowych, skąpe jego ilości pomiędzy włóknami tkanki łącznej. Z obserwacji wynika, że u królików karmionych cholesterolem i wapniem cholesterol występuje przeważnie w postaci estrów, ilość zaś wolnego cholesterolu w skórze jest znacznie mniejsza w porównaniu z królikiem karmionym wyłącznie cholesterolem. Wydaje się, że glukonian wapnia przyczynia się do kontrolowanej gospodarki cholesterolowej, albowiem zmniejsza wyraźnie ilość zalegającego choleste-

rolu pomiędzy włóknami tkanki łącznej. Ważny może być także fakt, że u badanych królików nie spostrzega się tworzenia dużych czopów rogowych i zanikania mieszków włosa i gruczołów łojowych. O tym, że podanie glukonianu wapnia przyczynia się do estryfikacji wolnego cholesterolu w organizmie świadczą także wyniki badań serologicznych, z których wynika, że stosunek wolnego cholesterolu do jego estrów zmniejsza się wyraźnie u królików karmionych wapniem oraz łącznie wapniem i cholesterolom. Stosunek ten u królika kontrolnego przedstawiał się jak 5:7, u wymienionych wyżej królików jak 1:4 i 1:6.



Wykres 1. Zawartość cholesterolu w surowicy krwi u królików po 3 miesięcznym karmieniu: a — cholesterolom i wapniem, b — cholesterolom, c — wapniem, d — u królika kontrolnego; 1 — całkowity, 2 — estry, 3 — wolny

Content of cholesterol in the blood serum of rabbits 3 months after administration of: a — cholesterol and calcium, b — cholesterol, c — calcium, d — in control rabbit; 1 — total, 2 — esters, 3 — free

Zmiany miażdżycowe były wyraźniejsze u królika, któremu podawano cholesterol, zaś mniej zaznaczone u królików karmionych cholesterolom i wapniem. Badania histochemiczne i w świetle spolaryzowanym wykazały, że u pierwszego z nich grudki miażdżycowe zawierały zarówno estry cholesterolu, jak i wolny cholesterol. U drugiego zaś stwierdzono, że złożki lipidowe składały się prawie wyłącznie z estrów cholesterolu. Nie spostrzegano ziarenek wapnia w grudkach miażdżycowych w jednym jak i w drugim wypadku. Łysanowicz, Górski i Kędra omówili zagadnienie wpływu różnych związków chemicznych na powstawanie zmian miażdżycowych i na podstawie własnych badań stwierdzili, że kofeina wywiera działanie korzystne w miażdżycy (12). Pomimo że wapń zwiększa krzepliwość, badania nasze przemawiają za tym, że i glukonian wapnia może mieć wpływ podobny. Wniosek nasz jest jednak oparty na niedostatecznej liczbie przebadanych zwierząt i wymaga dalszych badań.

Wnioski

1. U królików albinosów nie wykrywa się metodą von Kossa obecności wapnia w naskórku.

2. U królików karmionych glukonianem wapnia ziarenka wapnia można stwierdzić w świetle naczyń i w ich ściankach. Podanie glukonianu wapnia powoduje zwiększoną czynność gruczołów łojowych w skórze, odkładanie się cholesterolu w komórkach chrząstki oraz bardzo wyraźne zmniejszanie się wolnego cholesterolu we krwi i w skórze na korzyść jego estrów.

3. W skrawkach pobranych u królików, którym podano cholesterol, ilość cholesterolu w skórze wybitnie zwiększa się. Cholesterol i jego estry odkładają się także pomiędzy włóknami tkanki łącznej. Nadmiar cholesterolu przyczynia się do powstawania czopów rogowych w mieszkach włosa i w gruczołach łojowych oraz powoduje ich zanik. Podawanie glukonianu wapnia częściowo znosi to działanie.

4. Po trzymiesięcznym karmieniu królików cholesterolem, jak też cholesterolem i glukonianem wapnia grudki miażdżycowe w tętnicy głównej nie wykazują obecności ziarenek wapnia.

5. Glukonian wapnia powoduje estryfikację wolnego cholesterolu i wywiera korzystny wpływ na zmiany miażdżycowe.

PIŚMIENICTWO

1. Chorążak T.: Cholesteryna we krwi i w naskórku w dermatozach z nieprawidłowym rogowaceniem. *Przegl. Dermatol.* **28**, 111—118, 1953.
2. Czochra-Łysanowicz Z., Górski M., Kędra M.: Wpływ nikotyny i kofeiny na rozwój miażdżycy u królików. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sec. D.* **14**, 181—199, 1959.
3. Grzycki St.: cyt. wg Chorążaka.
4. Kudejko J.: Badania histotopochemiczne cholesterolu i wapnia w skórze ludzkiej. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sec. D.* **18**, 53—82, 1963.

OBJAŚNIENIA RYCIŃ

Ryc. 1. Skóra z ucha królika po 3 miesiącach karmienia glukonianem wapnia. Barwienie wg metody von Kossa wg Bagińskiego. W świetle naczyńia żylnego i tętniczego oraz w ich ściankach widoczne są dość liczne ziarenka wapnia. Pow. 100 ×.

Ryc. 2. Skóra z ucha królika (nr 10), po 3 miesięcznym podawaniu cholesterolu. Światło mieszkła włosowego wybitnie rozszerzone i wypełnione masami rogowymi. Pow. 100 ×.

Ryc. 3. Skóra z ucha królika (nr 11) po 3 miesięcznym podawaniu cholesterolu. Tworzenie się torbieli w gruczołach łojowych. Pow. 100 ×.

Ryc. 4. Skóra z ucha królika (nr 16) po 3 miesięcznym podawaniu cholesterolu. Mieszek włosa wybitnie rozszerzony i wypełniony masami rogowymi. Pow. 100 ×.

Ryc. 5. Skóra z ucha królika (nr 11), karmionego przez 3 miesiące cholesterolom. Badanie w świetle spolaryzowanym. Pod naskórkiem stwierdza się bardzo dużą ilość kryształków podwójnie załamujących światło. W części środkowej widoczny mieszek włosowy wypchany masami rogowymi. Pow. 100 ×.

Ryc. 6. Skóra z ucha królika (nr 11) karmionego cholesterolom po wypłukaniu estrów cholesterolu. W gruczołach łojowych i pomiędzy włóknami tkanki łącznej występują liczne kryształki podwójnie załamujące światło. Pow. 100 ×.

Ryc. 7. Ucho królika (nr 13) karmionego cholesterolom. Badanie wg metody histochemicznej Feigina na obecność cholesterolu i jego estrów. Naczynia żyłne silnie zabarwione na ciemnofioletowo. Pow. 100 ×.

Ryc. 8. Obraz makroskopowy tętnic głównych u królika po 3 miesięcznym karmieniu glukonianem wapnia i cholesterolom (nr 4), cholesterolom (nr 7), glukonianem wapnia (nr 3) u królika kontrolnego (nr 8). Zmiany miażdżycowe są mniej wyraźne u królika, któremu podawano cholesterol i glukonian wapnia niż u królika karmionego samym cholesterolom. Brak zmian u królika karmionego glukonianem wapnia i u królika kontrolnego.

Ryc. 9. Tętnica główna królika (nr 7), któremu podawano przez 3 miesiące cholesterolu. Grubość grudki miażdżycowej jest mniej więcej taka sama, jak grubość ścianki tętnicy. Pow. 100 ×.

Ryc. 10. Tętnica główna królika (nr 7) karmionego przez 3 miesiące cholesterolom. Skrawek digitoninowy w świetle spolaryzowanym po wypłukaniu estrów cholesterolu. W grudce miażdżycowej występuje spora ilość kryształków anizotropowych wolnego cholesterolu. Pow. 100 ×.

Ryc. 11. Tętnica główna królika (nr 7) karmionego przez 3 miesiące cholesterolom. Skrawek badany przy użyciu metody histochemicznej Feigina na obecność cholesterolu i jego estrów. Stwierdza się fioletowe i ciemnofioletowe zabarwienie zmian miażdżycowych. Pow. 100 ×.

Ryc. 12. Tętnica główna królika (nr 7) karmionego przez 3 miesiące cholesterolom. Skrawek barwiony wg metody Feigina na obecność wolnego cholesterolu. Zmiany miażdżycowe zabarwione na fioletowo, ciemno barwiące się kuleczki wolnego cholesterolu umiejscowione w dolnych warstwach. Pow. 100 ×.

Ryc. 13. Tętnica główna królika (nr 4), któremu przez 3 miesiące podawano cholesterol i glukonian wapnia. Badanie w świetle spolaryzowanym. Grudki miażdżycowe niezbyt grube zawierają liczne kryształki anizotropowe. Pow. 100 ×.

Ryc. 14. Tętnica główna królika (nr 4), któremu podawano przez 3 miesiące cholesterol i glukonian wapnia. Badanie w świetle spolaryzowanym. Skrawek digitoninowy po wypłukaniu estrów cholesterolu. W grudce miażdżycowej brak kryształów podwójnie załamujących światło. Pow. 100 ×.

СОДЕРЖАНИЕ

Исследования проведены на 6 кроликах-альбиносах до и после 3-х месячного их кормления холестеролом и кальцием, а также на 8 серых кроликах после такого же срока подачи холестерола. У кроликов кальций и холестерол определялись в аорте, сыворотке

крови и в коже. Гистопатологические исследования холестерина и кальция в срезах проводились по методу фон Косса, Фейгина и в поляризованном свете. Установлено:

1) Подача кальция обуславливала увеличение деятельности сальных желез кожи, откладывание холестерина в хрящевых клетках и уменьшение свободного холестерина в крови и в коже.

2) Избыток холестерина способствовал возникновению роговых образований в волосяных фолликулах и в сальных железах, а затем их исчезновению. Подача кальция частично уравнивала это действие.

3) У кроликов, вскармленных холестерином, кальций отчетливо способствовал изменению свободного холестерина в сыворотке крови, одновременно уменьшал количество общего и свободного холестерина в коже и в склеротических изменениях.

Рис. 1. Кожа из уха кролика после 3-х месячного вскармливания кальцием. Окрашено методом фон Косса, согласно Багинскому. В просвете артериального и венозного сосуда, а также в их стенках видны многочисленные зерна кальция. Увелич. 100X.

Рис. 2. Кожа из уха кролика (№ 10), после 3-х месячной подачи холестерина. Просвет волосяных фолликул отчетливо расширен и наполнен роговыми массами. Увелич. 100X.

Рис. 3. Кожа из уха кролика (№ 11), после 3-х месячной подачи холестерина. Образование цист, наполненных роговыми пробками в сальных железах. Увелич. 100X.

Рис. 4. Кожа из уха кролика (№ 16), после 3-х месячной подачи холестерина. Просвет волосяных фолликулов отчетливо расширен и наполнен роговыми массами. Увелич. 100X.

Рис. 5. Кожа из уха кролика (№ 11), вскармливаемого в течение 3-х месяцев холестерином. Исследования в поляризованном свете. Под эпидермисом видно большое количество кристалликов, вдвойне преламливающих свет. В срединной части виден волосяной фолликул, наполненный роговыми массами. Увелич. 100X.

Рис. 6. Кожа из уха кролика (№ 11), вскармливаемого холестерином после экстракции эстринов холестерина. В сальных железах и между волокнами соединительной ткани видны многочисленные кристаллики, вдвойне преламливающие свет. Увелич. 100X.

Рис. 7. Ухо кролика (№ 13), кормленного холестерином. Исследование гистохимическим методом Фейгина на присутствие холестерина и его эстринов. Венечные сосуды сильно окрашены в темнофиолетовый цвет. Увелич. 100X.

Рис. 8. Макроскопическая картина аорты у кролика после 3-х месячного кормления кальцием и холестерином (№ 4), холестерином (№ 7), кальцием (№ 3) и у контрольного кролика. Атероматозные изменения являются менее выраженными у кролика, которому подавался холестерин вместе с кальцием, чем у кролика, получившего только холестерин.

Рис. 9. Аорта кролика (№7), который получал в течение 3-х месяцев холестерин. Толщина склеротических бляшек соответствует толщине стенки аорты. Увелич. 100X.

Рис. 10. Аорта кролика (№ 7), кормленного в течение 3-х месяцев холестеролом. Дигитининовый препарат в поляризованном свете после экстракции эстров холестерола. В атероматозной бляшке небольшое количество анизотропных кристалликов свободного холестерола. Увелич. 100X.

Рис. 11. Аорта кролика (№ 7), вскармливаемого в течение 3-х месяцев холестеролом. Срез, исследованный гистохимическим методом Фейгина на присутствие холестерола и его эфиров. Видно фиолетовое и темнофиолетовое окрашивание склеротических изменений. Увелич. 100X.

Рис. 12. Аорта кролика (№ 7), кормленного холестеролом в течение 3-х месяцев. Препарат, исследованный методом Фейгина на присутствие свободного холестерола. Склеротические изменения окрашены в фиолетовый цвет, темно окрашенные шарики свободного холестерола локализованы в нижних слоях. Увелич. 100X.

Рис. 13. Аорта кролика (№ 4), который получал в течение 3-х месяцев холестерол и кальций. Исследовано в поляризованном свете. Склеротические бляшки сравнительно небольшие, содержат многочисленные анизотропные кристаллики. Увелич. 100X.

Рис. 14. Аорта кролика (№ 4), которому подавался в течение 3-х месяцев холестерол и кальций. Исследования в поляризованном свете. Дигитининовый препарат после экстракции эстеринов холестерола. В склеротических образованиях отсутствуют кристаллы, вдвойне преламливающие свет. Увелич. 100X.

S U M M A R Y

The examination was carried out on six albino rabbits and on eight gray rabbits after treating them with cholesterol and calcium gluconate for a period of three months. Out of six rabbits one animal was given 1 g of cholesterol per day, two rabbits were given 1 g of calcium gluconate per day, and two other were given cholesterol (1 g) and calcium gluconate (1 g) simultaneously. One rabbit was left out as control. Apart from them eight rabbits were given only 1 g of cholesterol per day. The time of administration was 3 months. The amount of cholesterol and calcium gluconate was estimated in the skin, aorta and in the serum through von Kossa's and Feigin's methods and the use of polarized light. The specimens were also stained with haematoxylin, eosin, resorcin and fuchsin. The observations enabled the author to draw the following conclusions.

1. Calcium gluconate caused an increased activity in sebaceous glands in the skin, the accumulation of cholesterol in the cells of the cartilage, a decrease of free cholesterol in the serum and skin in favour of esters.

2. In the rabbits treated with cholesterol the excess of it caused the formation of kerotic plugs in the hair follicles, the atrophy of sebaceous glands in hair follicles. The administration of calcium glu-

conate partly reduced the degenerating activity of cholesterol in the glands and hair follicles.

3. In the rabbits treated with cholesterol calcium gluconate resulted in a decrease of free cholesterol in the serum and reduced the amount of free cholesterol and its esters in the skin and the atheromatous process in the aorta.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. The skin of the rabbit's ear after three months of administration of calcium gluconate. Von Kossa's stain according to Bagiński. In the lumen of the vein and artery and in their walls numerous grains of calcium are visible. Magn. 100 ×.

Fig. 2. The skin of the rabbit's ear (No. 10) treated with cholesterol for three months. The hair follicle strongly dilated and filled with keratotic mass. Magn. 100 ×.

Fig. 3. The skin of the rabbit's ear (No. 11) treated with cholesterol for three months. Formation of keratotic plugs in the sebaceous gland. Magn. 100 ×.

Fig. 4. The skin of the rabbit's ear (No. 16) treated with cholesterol for three months. The hair follicle strongly dilated and filled with keratotic mass. Magn. 100 ×.

Fig. 5. The skin of the rabbit's ear (No. 11) treated with cholesterol for three months. The examination was carried out under polarized light. Beneath the epidermis a lot of birefringent spherocrystals are visible. Magn. 100 ×.

Fig. 6. The skin of the rabbit's ear treated with cholesterol. The specimen was devoid of cholesterol esters by alcohol and ether bath. In the sebaceous glands and between collagen fibres numerous anisotropic crystals are visible. Magn. 100 ×.

Fig. 7. The skin of the rabbit's ear (No. 13) treated with cholesterol. The specimen was stained with Feigin's method to detect cholesterol and its esters. The veins are coloured dark violet. Magn. 100 ×.

Fig. 8. The macroscopic picture of the aorta in the rabbits which were given calcium gluconate and cholesterol (No. 4), cholesterol (No. 7), calcium gluconate (No. 3) and in the control rabbit (No. 8). Atheromatous changes are less evident in the rabbit which received cholesterol and calcium gluconate simultaneously than in the rabbit which received cholesterol only. The lack of atheromatous changes in the control rabbit and in the rabbit which was given calcium gluconate.

Fig. 9. Aorta of the rabbit (No. 7) which was given cholesterol during the period of three months. The thickness of the atheromatous layer is the same as that of the wall of the aorta. Magn. 100 ×.

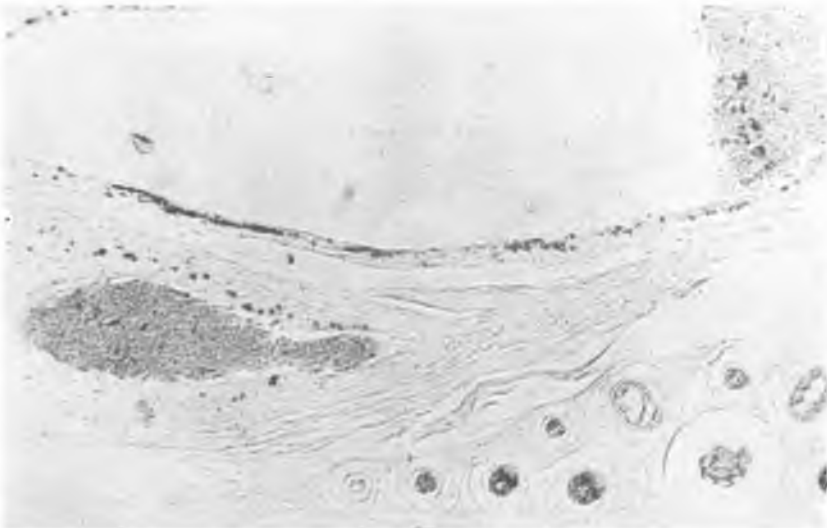
Fig. 10. Aorta of the rabbit (No. 7) which was given cholesterol during the period of three months. The specimen was treated with digitonin, and devoid of cholesterol esters by alcohol and ether bath. In the atheromatous layer a number of cholesterol free anisotropic crystals are visible. Magn. 100 ×.

Fig. 11. Aorta of the rabbit (No. 7) which was given cholesterol for three months. Histochemical Feigin's method to detect free cholesterol and its esters. The atheromatous layer stains violet or dark violet. Magn. 100 ×.

Fig. 12. Aorta of the rabbit (No. 1) which was given cholesterol for three months. Histochemical Feigin's method to detect free cholesterol. The atheromatous layer stained violet. Small balls of free cholesterol, stained dark, are observed at the bottom. Magn. 100 ×.

Fig. 13. Aorta of the rabbit (No. 4) which was given cholesterol and calcium gluconate. The specimen was examined under polarized light to detect cholesterol and its esters. The atheromatous layer, not very thick, contains numerous anisotropic crystals. Magn. 100 ×.

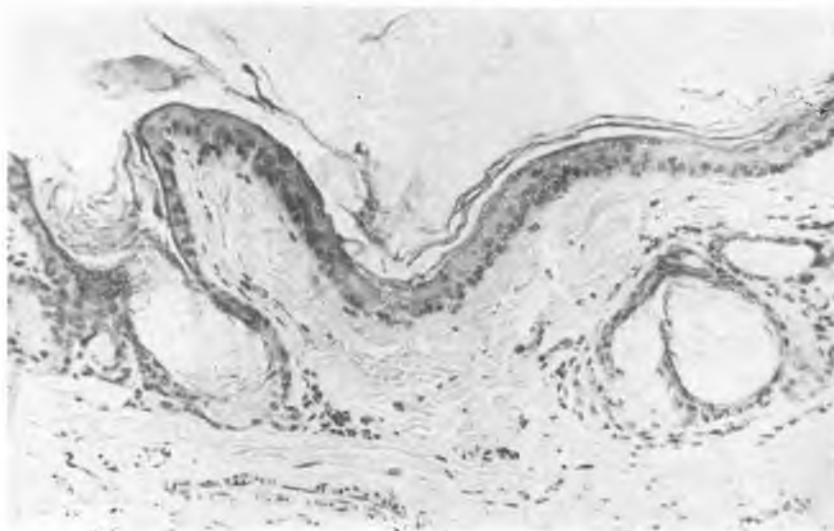
Fig. 14. Aorta of the rabbit (No. 4) which was given cholesterol and calcium gluconate for three months. Investigation under polarized light. The specimen was treated with digitonin and devoid of cholesterol. In the atheromatous layer lack of anisotropic crystals. Magn. 100 ×.



Ryc. 1



Ryc. 2



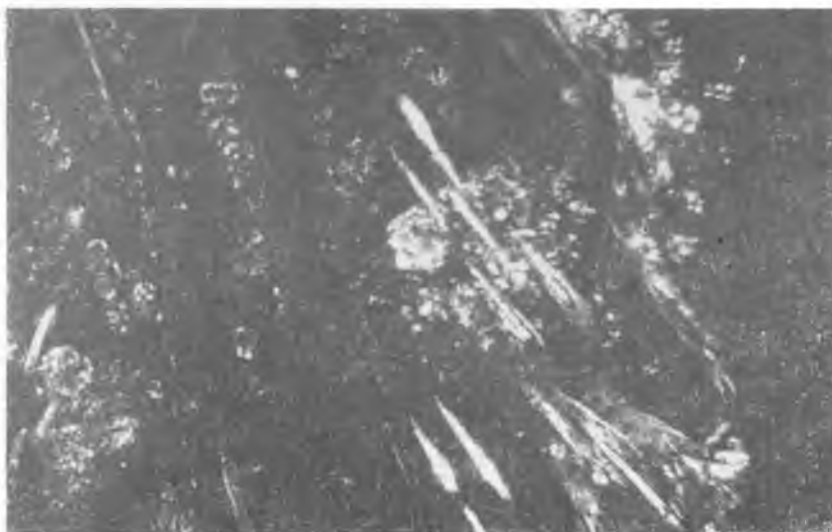
Ryc. 3



Ryc. 4



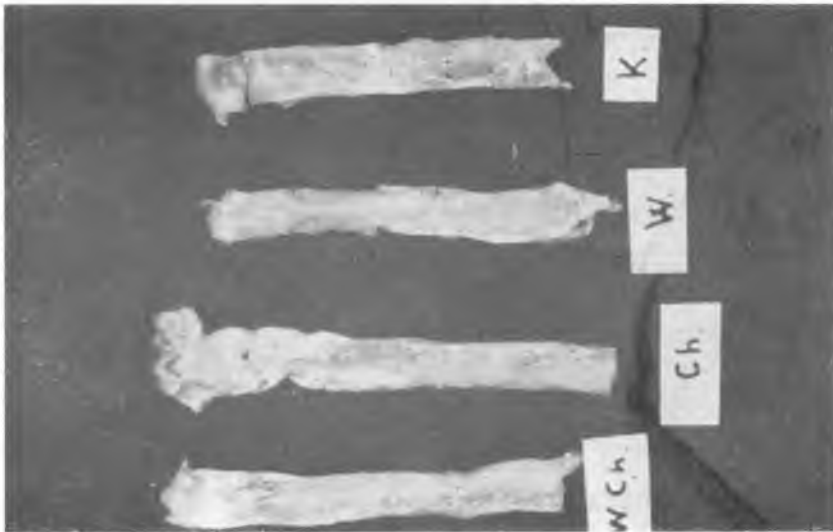
Ryc. 5



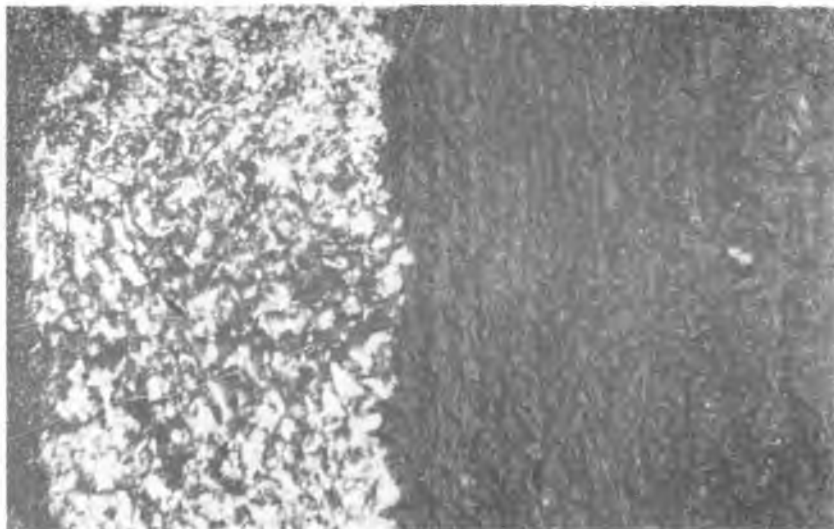
Ryc. 6



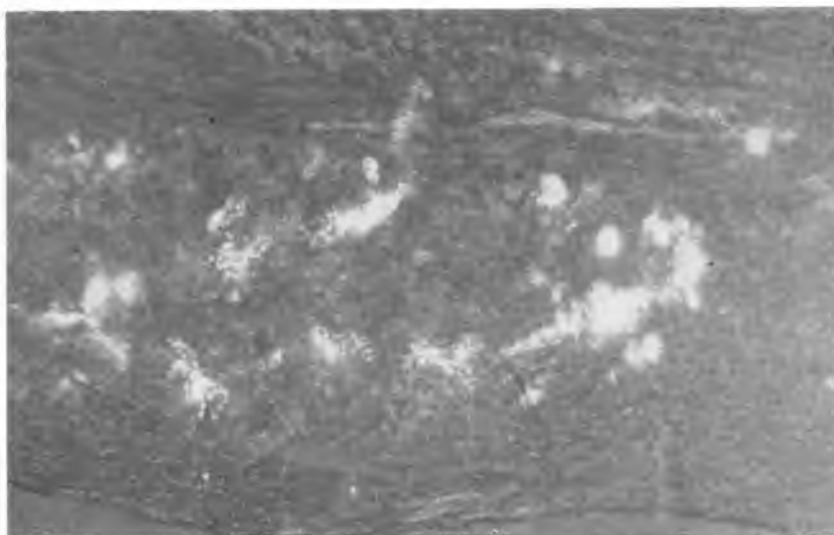
Ryc. 7



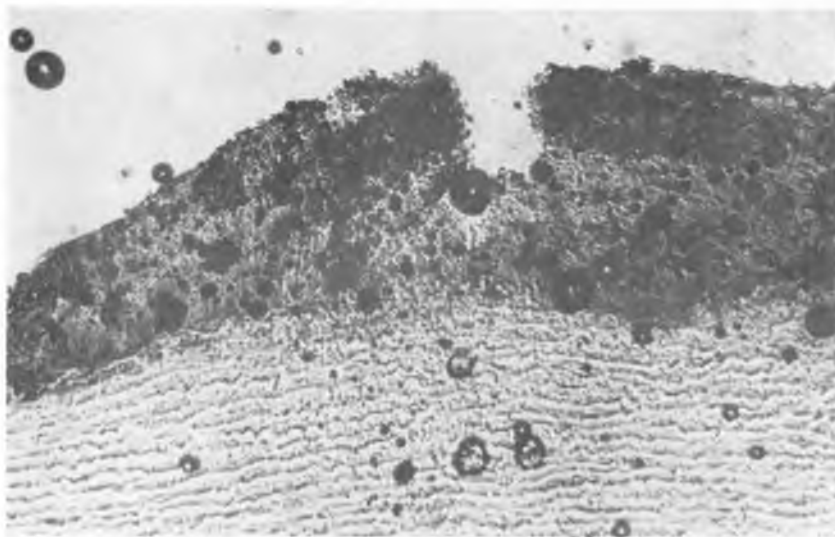
Ryc. 8



Ryc. 9



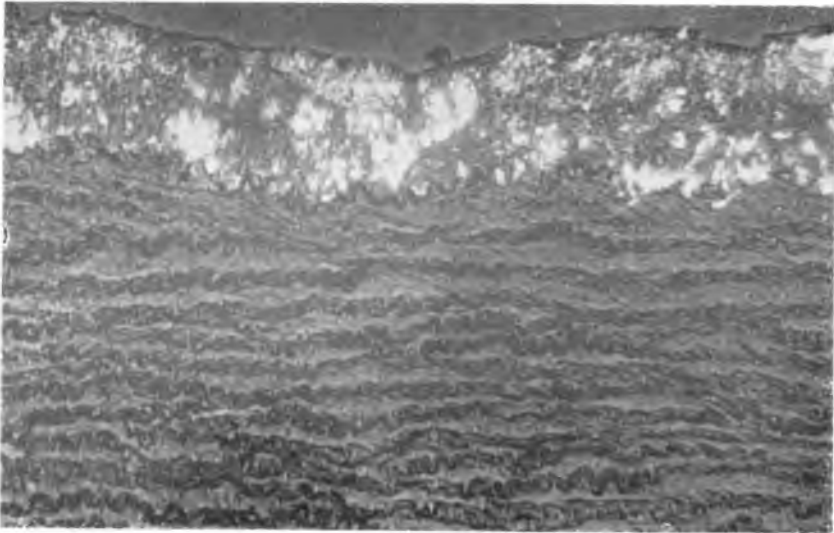
Ryc. 10



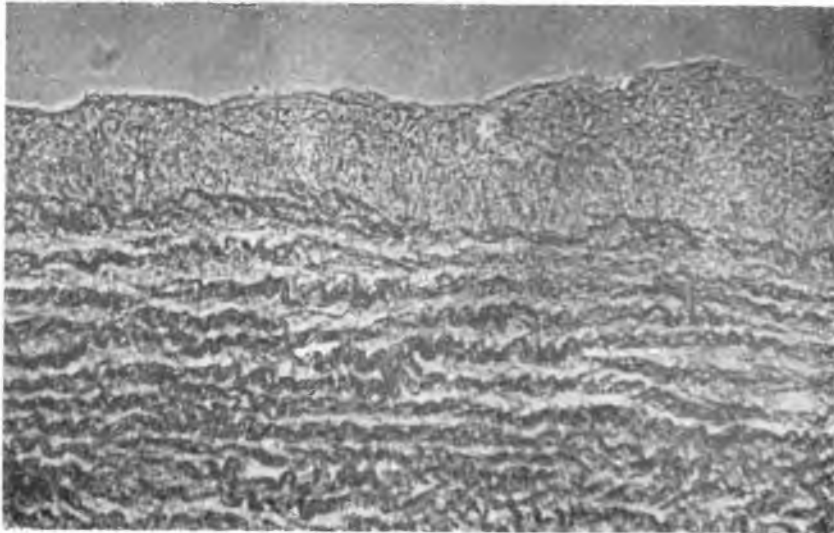
Ryc. 11



Ryc. 12



Ryc. 13



Ryc. 14

