

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

Józef STASZYC

Wpływ doświadczalnej wagotomii na cytofizjologię komórek enterochromafinowych

Влияние экспериментальной ваготомии на цитофизиологию энтерохромафиновых клеток

Effect of Experimental Vagotomy on the Cytophysiology of the Enterochromaffin Cells

Przeprowadzenie badań nad wpływem doświadczalnej wagotomii na odczyny histochemiczne i cytofizjologię komórek enterochromafinowych znajduje uzasadnienie w obserwacjach klinicznych (Dragsted i Ovens 1943, Polański i współ., 1967), które dowodzą, że przecięcie nerwów błędnych powoduje obniżenie czynności wydzielniczej gruczołów żołądka i jelit (Broome i Bergström 1966; Staszyc i współ. 1967) oraz zmianę flory bakteryjnej przewodu pokarmowego (Kraft, Fry, Ransom, 1962).

Do doświadczeń wykorzystano dojrzałe szczury białe i świnki morskie obu płci, pochodzące z hodowli własnej. Zwierzęta przygotowano do eksperymentu poprzez dobre warunki pomieszczenia, żywienia i łagodne z nimi postępowanie, by nie wywołać stresu powodującego zmianę wydzielania soków trawiennych (Gill i Małeckie 1970). Były one podzielone na 6 grup. Każda obejmowała po siedem osobników obydwu gatunków. Z tego u czterech przecinano n. błędne, jednemu dokonywano próbnej laparotomii, a dwa stanowiły materiał kontrolny w stosunku do tych, które były operowane.

Po uśpieniu w głębokiej narkozie eterowej przecinano n. błędne drogą brzuszną, gdyż wagotomia nadprzeponowa dawała bardzo dużą śmiertelność śródoperacyjną. Okres pooperacyjny przebiegał bez powikłań. Zachowanie się zwierząt operowanych nie wykazywało uchwytnych różnic w porównaniu z kontrolnymi. Ciężar ciała nie uległ również istotnym zmianom.

Dwunastnicę pobierano do badania jednocześnie po 7 (grupa I), 10 (grupa II), 13 (grupa III), 16 (grupa IV), 19 (grupa V) oraz 22 (grupa VI) dniach od zabiegu i poddano jednoczasowej ocenie cytochemicznej. Wycinki dwunastnicy do badań histochemicznych utrwalano w płynie Bakera i krajano na mikrotomie typu Pearse'a. Do pozostałych prób zastosowano utrwalacze Carnoy'a i Gendre'a. Badania histochemiczne przeprowadzano na kwasy dezoksyrybonukleinowy (DNA) i rybonukleinowy (RNA) wg metod Feulgena i Bracheta. Fosfatazy zasadową (Fz) i kwaśną (Fk) wykrywano wg m. Gomoriego, natomiast adenozynotrójfosfatazę (ATP-azę) oznaczano wg m. Wachsteina i Meisela. Metodą PAS z odczynnikiem Schiffa, a Blooma i Kellego z błękitem astra barwiono mukopolisacharydy obojętne i kwaśne, zaś serotoninę barwnikiem dwuazowym Fast Red B.

BADANIA WŁASNE

Grupy kontrolne

Szczury: komórki enterochromafinowe występowały w większej liczbie w kryptach Lieberkühna (ryc. 1) niż na wolnej powierzchni kosmków jelitowych. Okrągłe ich jądro z nielicznymi ziarnami i grudkami Feulgen dodatnimi i z jednym lub dwoma jąderkami ułożone było w środkowej części komórki (ryc. 2). Stopień ich wybarwienia nie różnił się wyraźnie od sąsiadujących enterocytów. Odczyn pironinochłonny jąderek przypominał aktywność RNA w cytoplazmie. Ziarnistości zidentyfikowane jako serotoninina rozrzucone były w eozynochłonnej cytoplazmie, przeważnie w strefie dokołajądrowej. Pomędzy nimi obserwowano dodatni odczyn na mukopolisacharydy obojętne, odporne na działanie diastazy (ryc. 3). Pod wpływem dimedonu odczyn PAS był ujemny. Mukopolisacharydy kwaśne wykrywano na całym obszarze cytoplazmy. Po metylacji aktywności nie stwierdzono. Pozytywne reakcje na Fz zaznaczyły się bardzo silnie w błonie komórkowej. Odczyny na Fk uwidoczniły się w formie struktur odpowiadających licznym i jednolicie rozmieszczonym lizosomom. Ziarnisty odczyn na ATP-azę lokalizował się przeważnie wokół jądra komórkowego.

Świnki morskie: wrzecionowate komórki enterochromafinowe leżały w kryptach Lieberkühna. Było ich znacznie więcej niż u szczurów i tworzyły one całe zespoły komórkowe (ryc. 4). Jądro z rzadkim zrębem chromatynowym układało się przypadkowo lub w środkowej części komórki. Kwas rybonukleinowy w jąderkach i cytoplazmie wystąpił w postaci rozproszonych ziarenek, wybarwiających się podobnie. Ziarnistości diazopozytywne drobne i liczne wybarwione na kolor brązowo-czerwony uwidaczniały się w całej cytoplazmie lub tylko w pobliżu jądra. Część przywierzchołkowa komórki była zawsze wolna. Mukopolisacharydy obojętne i kwaśne rozmieszczone w cytoplazmie barwiły się intensywnie. Kontrolne trawienie skrawków dimedonem i diastazą oraz metylacja potwierdziły naszą interpretację w odniesieniu do charakteru tych związków. Błona komórkowa dała dodatnie reakcje na Fz. Aktywność tej fosfatazy zaznaczała się również i w śródbłonku naczyń włosowatych. Lizosomy rozrzucone w cytoplazmie wykazywały jednolicie intensywny odczyn na Fk. Aktywność ATP-azy była szczególnie wyraźna wokół jądra.

U zwierząt, którym wykonano tylko laparotomię, odczyny histologiczne i histochemiczne komórek enterochromafinowych przypominały reakcje obserwowane na preparatach kontrolnych.

Grupy doświadczalne

Grupa I (7 dni po operacji). Barwiąc preparaty wg m. Feulgena nie znaleziono wyraźnych różnic w rozmieszczeniu i w barwliwości grudek chromatyny w komórkach enterochromafinowych. Natomiast RNA wykazywał różnicę w intensywności wybarwienia się w jąderkach i cytoplazmie zarówno u szczurów (ryc. 5), jak i u świnek morskich. Znaczną pironinochłonność stwierdzano w części przypadkowej komórek, stykających się z naczyniami krwionośnymi. Reakcja PAS oraz odczyn Blooma i Kellego nie były tak intensywne, jak w grupie kontrolnej. Ziarnistości

diazopozytywne tworzyły duże grudki, które leżały pojedynczo w polu przyjądrowym lub pod błoną komórkową. Dało się również zauważyć różnej szerokości puste przestrzenie cytoplazmy, tzw. „halo”, pozbawione w ogóle tych ziarenek. Odczyny cytochemiczne tak u szczurów, jak i u świnek morskich uległy zmianom, szczególnie wyraźnym w komórkach o małej liczbie ziaren specyficznych. Obniżyły się mianowicie reakcje na aktywność Fz w błonie komórkowej, ATP-azy oraz Fk w lizosomach, których było znacznie mniej.

Grupa II (10 dni po operacji). Zarówno u szczurów, jak i w materiale ze świnek morskich wyrównał się stopień wybarwienia RNA w jąderkach i cytoplazmie komórek enterochromafinowych. W porównaniu z grupą doświadczalną I wzrosła aktywność reakcji PAS oraz Blooma i Kellego. Natomiast odczyny na badane fosfatazy nadal były niższe niż w grupie zwierząt kontrolnych. Fz w niektórych komórkach dała odczyny słabo dodatnie lub nawet ujemne (ryc. 6). Ziarenka diazododatnie w komórkach szczurów były nieliczne, bryłowate i układały się w pobliżu jądra lub części przypodstawnej. Obserwowano również w wielu komórkach strefy bezzianiste.

Grupa III (13 dni po operacji). Reakcje PAS oraz stopień wybarwienia mukopolisacharydów kwaśnych przypominały odczyny z grup kontrolnych. Słabo dodatnia aktywność na Fz, ATP-azę oraz Fk utrzymywała się nadal. Również w śródbłonku naczyń reaktywność na Fz i ATP-azę była niższa niż na preparatach porównawczych. Spotykano też i tutaj komórki enterochromafinowe pozbawione prawie całkowicie ziarnistości specyficznych, tzw. „komórki cienie” (ryc. 7). U szczurów było więcej komórek enterochromafinowych pozbawionych serotoniny niż u świnek morskich.

Grupa IV (16 dni po operacji). U świnek morskich wzrosła aktywność na badane enzymy. U zwierząt tych ziarna specyficzne stopniem wybarwienia oraz rozmieszczeniem przypominały grupę kontrolną. Natomiast u szczurów, gdzie aktywność Fz i ATP-azy była jeszcze słabsza, były one grube i bryłowate. W komórkach tych również lizosomy występowały w zmniejszonej liczbie.

Grupa V (19 dni po operacji). W porównaniu z grupą IV obserwowano u szczurów żywszą aktywność na Fz i ATP-azę i większą liczbę lizosomów. Ziarnistości specyficzne były liczniejsze jak w grupach poprzednich, drobne, ale występowały jeszcze przestrzenie bezzianiste w części przypodstawnej cytoplazmy.

Grupa VI (22 dni po operacji). Preparaty z obydwu grup doświadczalnych przypominały materiał kontrolny. Spostrzeżenia te odnosiły się szczególnie do świnek morskich, u których na wolnej powierzchni kosmków dwunastnicy pojawiły się liczne komórki enterochromafinowe (ryc. 8), wypełnione znaczną liczbą ziarenek serotoniny.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Vialli i Erspamer (1937) stwierdzili, że wybarwiane ziarnistości w komórkach enterochromafinowych odpowiadają 5-hydroksytryptaminie, którą Erspamer i Asero (1951) oraz Rapport i współ. (1958) zidentyfikowali jako serotoninę. Przewód pokarmowy zawiera około 90% tego neurohormonu, a największym

skupieniem komórek, w których zachodzi przyłączenie grupy hydroksylowej do tryptofanu, jest dwunastnica (Dalghiesh i Dutton 1957).

Obserwacje nasze rozpoczęliśmy dopiero po 7 dniach od doświadczalnego przecięcia nerwów błędnych, ponieważ zabiegi na jamie brzusznej wykonane w narkozie ogólnej lub znieczuleniu miejscowym wywołują zmiany poziomu serotoniny (Brodie — 1958, Curtis i Davis — 1961). Ponadto chcieliśmy uniknąć badań w okresie stressu chirurgicznego, co ma szczególne znaczenie przy tego rodzaju doświadczeniach (Marczyński — 1957, Bałak — 1960, Kurzępa i Chojecka 1962). Wprowadziliśmy obok zwierząt kontrolnych również grupę pozornie operowanych, co pozwoliło różnicować zmiany cytochemiczne zachodzące po samej laparotomii, od odczynów enzymatycznych wywołanych przecięciem nerwów błędnych. Materiał do badań pobieraliśmy stale o jednej porze dnia, ponieważ wg Quay'a (1963) zawartość serotoniny w komórkach wykazuje rytmikę dobową, która jest kontrolowana przez układ nerwowy a działanie jej związane jest z mechanizmem odwracalnego i cyklicznego przenikania jonów wapnia przez błony komórkowe (Schramm i współ. 1965).

W siedem dni po wagotomii obserwowano w komórkach enterochromafinowych z obu gatunków zwierząt zmniejszenie aktywności RNA. Nastąpiła też zmiana barwliwości mukopolisacharydów i to zarówno obojętnych, jak i kwaśnych, co wskazuje na uszkodzenie metabolizmu wewnątrzkomórkowego. Obniżenie ilości glikogenu tłumaczyć można również utrudnionym transportem cukrów prostych, albo też utratą możliwości polimeryzacji ich do wielocukrów. Grzycki (1951, 1953) sądzi, że taki zespół objawów świadczy o zmianie rytmu procesów wydzielniczych.

W grupie drugiej liczba PAS dodatnich ziarenek była wyraźnie większa niż w pierwszym okresie badania. Silniejsze odczyny dało również barwienie błękitem astra na mukopolisacharydy kwaśne. Powrót do wartości przypominających kontrolne widoczny był po 13 dniach od operacji, w związku z czym sądzimy, że zakłócony metabolizm węglowodanów zaczyna wracać do normy.

Zmniejszenie aktywności na Fk w lizosomach powstało na skutek zmian mikro-metabolizmu w cytoplazmatycznych strukturach. Biorąc pod uwagę fakt, że fosfataza ta jest wykładnikiem katabolicznych procesów wewnątrzkomórkowych (Shamberger — 1969) twierdzimy za Novikoffem (1959), że wagotomia spowodowała „uszkodzenie” komórek enterochromafinowych i poprzez zmiany w błonach lizosomalnych. Osłabienie reakcji na Fk w pierwszych grupach wskazuje również na zaburzenie fosforylacji glikozy, a wyrazem tego były w naszej pracy obniżone odczyny na glikogen. Wzrost Fk do wartości kontrolnych w grupach V i VI sugeruje zaangażowanie się jej w procesach adaptacyjnych zaszłych po przecięciu nerwów błędnych.

Obniżenie aktywności na Fz w grupach I, II i III oraz IV u szczurów można tłumaczyć ogólnobiologiczną właściwością tego enzymu w procesach czynnego transportu przez błony komórkowe oraz aktywną rolę w syntezie kwasów nukleinowych.

ATP-aza obok udziału w transporcie jest zaangażowana w tlenowej fosforylacji

w mitochondriach. Dlatego też zmienność jej reakcji histochemicznych we wszystkich grupach doświadczalnych dowodzi czynnościowego zróżnicowania się komórek enterochromafinowych po wagotomii.

W pierwszej grupie doświadczalnej pojawiły się zmiany ilościowe ziarenek specyficznych w komórkach enterochromafinowych. W dalszym okresie eksperymentu obserwowano również bezziałne przestrzenie w cytoplazmie — „halo”, a nawet tzw. „cienie komórkowe”, w których były tylko ślady serotoniny. Zauważono tutaj nieznaczne różnice gatunkowe, co być może ma związek z cyklem tryptofanowym charakterystycznym dla szczurów. Barry (1943) i Czerny (1968) uważają, że morfologiczne zmiany ziarnistości enterochromafinowych mówią o zaistniałej polaryzacji czynnościowej, prowadzącej do zaburzenia funkcji wydzielniczej. W materiale naszym rozumowanie to zostało potwierdzone w zmiennej reaktywności enzymatycznej na Fz i ATP-azę.

Wiadomo, że prekursorem serotoniny w organizmie żywym jest tryptofan i że w komórkach enterochromafinowych zachodzi przyłączenie do niego grupy hydroksylowej. Na powstanie 5HT ma również wpływ utlenianie tkankowe. Biorąc pod uwagę różną aktywność ATP-azy sądzimy, że uległo ono „zwichnięciu”, ponieważ enzym ten jest współczynnikiem syntez 5HT w komórkach enterochromafinowych. Zauważyliśmy, że wahania ilościowe serotoniny w cytoplazmie komórek łączyły się ze zmianami aktywności Fz i ATP-azy. Było to szczególnie wyraźne w grupach II i III, w których ziarnistości serotoniny były nieliczne i bryłowate.

Wagotomia zmienia odczyn komórek gruczołowych żołądka i jelit (Staszyc i Królikowska-Prasał — 1967), co naszym zdaniem może mieć wpływ na przemiany metaboliczne komórek enterochromafinowych. Czech (1948) sądzi bowiem, że komórki te rozwijają się na dnie krypt Lieberkühna, a o ile zachodzi potrzeba przemieszczają się na powierzchnię kosmków (Górski — 1955). Dokonując wagotomii obniżyliśmy ilość wydzielanego kwasu solnego (Sawyers i współ. 1968), co miało wpływ na pH środowiska, a wg Georges'a i Herolda (1958) i na komórki enterochromafinowe, gdyż kwas solny uwalnia serotoninę z błony śluzowej przewodu pokarmowego. Tej możliwości nie wyklucza się, ponieważ teoria mechanizmu uwalniania serotoniny nie jest jeszcze całkowicie poznana.

Na podstawie uzyskanych wyników uważamy, że doświadczalne przecięcie nerwów błędnych wywołuje zmiany cytofizjologiczne komórek enterochromafinowych, objawiające się ilościowym zanikiem ziarenek serotoniny oraz zaburzeniem jej transportu. Nasilenie tych objawów uzależnione jest od czasu po dokonaniu wagotomii oraz właściwości osobniczych i gatunkowych zwierzęcia. Powrót do wartości kontrolnych zależy od ogólnej reaktywności organizmu.

PIŚMIENNICTWO

1. Bałak K. : Csl. Gynek. 39, 23—30, 1960.
2. Barry J. : La cellule argentaffine, Lyon 1943.
3. Brodie B. B. : Perg. Press. 64, 234—236, 1958.

4. Broome A., Bergström H.: *Acta Chirurg. Scand.* **132**, 170–174, 1966.
5. Curtis D. R., Davis R.: *Nature*, **192**, 1083–1086, 1961.
6. Czech K.: *Przeg. Lek.* **4**, 556–558, 1948.
7. Czerny K.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D.* **23**, 21–45, 1968.
8. Dalghiesh C. E., Dutton R. W.: *Cancer*, **11**, 296–309, 1957.
9. Dragstedt L.: *Ovens F.: Proc. Soc. Exper. Biol. and. Med.* **53**, 152–161, 1943.
10. Erspamer V., Asero B.: *Ric. Sci.* **21**, 2132–2136, 1951.
11. Georges G., Herold M.: *Therapie*, **35**, 570–578, 1958.
12. Gill J., Małeckki S.: *Zwierzęta Laboratoryjne*, **8**, 89–98, 1970.
13. Górski M.: *Pol. Tyg. Lek.* **20**, 661–665, 1955.
14. Grzycki S.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D.* **6**, 297–322, 1951.
15. Grzycki S.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D.* **8**, 193–321, 1953.
16. Kraft R., Fry W., Ronsom A.: *Arch. Surg.* **85**, 687–693, 1962.
17. Kurzępa S., Chojecka B.: *Ginek. Pol.* **33**, 229–234, 1962.
18. Marczyński T.: *Post. Hig. i Med. Dośw.* **11**, 17–22, 1957.
19. Novikoff A. B.: *Biol. Bull.* **117**, 389–391, 1959.
20. Polański W., Roefler W., Czerniakowska-Beylin W., Piechowski A., Zawadzki W.: *Pol. Tyg. Lek.* **5**, 164–169, 1967.
21. Quay W. B.: *Gen. Comp. Endocrinol.* **3**, 473–476, 1963.
22. Rapport M. M., Green A. A., Page J. H.: *J. Biol. Chem.* **176**, 1243–1253, 1948.
23. Sawyers J., Scot H., Edwards W., Shukk H., Law D.: *Amer. J. Surg* **115**, 165–171, 1968.
24. Schramm R. W., Schrammowa H.: *Postępy Biochemii* **4**, 521–539, 1965,
25. Shamberger R. J.: *Biochem. J.* **111**, 375–383, 1969.
26. Staszyc J., Królikowska-Prasał I.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D.* **22**, 237–246, 1967.
27. Staszyc J., Królikowska-Prasał I.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D.* **22**, 257–264, 1967.
28. Vialli M., Erspamer V.: *Boll. Soc. Med. Chir. Pavia* **51**, 355–361, 1937.

Otrzymano 8.V.1971.

OBJAŚNIENIA DO RYCIN

- Ryc. 1. Świnka morska, kontrolna. Dwunastnica. Komórki enterochromafinowe w kryptach Lieberkühna. Barwienie Fast Red B. Pow. ca 700 ×.
- Ryc. 2. Szczur, kontrolny. Dwunastnica. Chromatyna w jądrach komórek enterochromafinowych wybarwiona wg m. Feulgena. Pow. ca 200 ×.
- Ryc. 3. Szczur, kontrolny. Dwunastnica. Barwienie PAS z odczynnikiem Schiffa na mukopolisacharydy obojętne. Pow. ca 200 ×.
- Ryc. 4. Świnka morska, kontrolna. Dwunastnica. Zespoły komórek enterochromafinowych w kryptach Lieberkühna. Barwienie Fast Red B. Pow. ca 400 ×.
- Ryc. 5. Szczur. Grupa I. Dwunastnica. RNA wybarwiony wg m. Bracheta. Pow. ca 700 ×.
- Ryc. 6. Szczur. Grupa II. Dwunastnica. Nierównomierny odczyn na Fz. Barwienie wg m. Gomoriego. Pow. ca 200 ×.
- Ryc. 7. Świnka morska. Grupa III. Dwunastnica. Widoczne „komórki cienie” — ze śladami ziarenek serotoniny. Barwienie Fast Red. B. Pow. ca 400 ×.
- Ryc. 8. Świnka morska. Grupa VI. Dwunastnica. Wybarwione komórki enterochromafinowe przy pomocy Fast Red B na powierzchni kosmków. Pow. ca 700 ×.

РЕЗЮМЕ

Автор сделал поддиафрагмальный разрез у белых крыс и морских свинок блуждающих нервов, а потом после 7, 10, 13, 16, 19 и 22 дней наблюдал в энтерохромофиновых клетках двенадцатиперстной кишки специфические зернистости, соответствующие серотонину, и реакции на нуклеиновые кислоты, мукополисахариды, кислую и основную фосфатазу и АТФ-азу.

На основе полученных гистохимических и гистологических результатов сделан вывод, что ваготомия влияет на метаболизм и нарушает транспорт серотонина из энтерохромофиновых клеток. Интенсивность этих изменений зависит как от послеоперационного периода, так и от видовых черт животного.

SUMMARY

The author made a subphrenic section through the vagus nerves of white rats and guinea pigs. Then, after 7, 10, 13, 16, 19 and 22 days he observed specific granules corresponding to serotonin as well as reactions to nucleic acids, mucopolysaccharides, acid and alkaline phosphatases, and ATP-ase in enterochromaffin cells of the duodenum.

On the basis of histochemical and histological results he arrived at the conclusion that vagotomy brings about changes in the metabolism and disturbances in the transport of serotonin from the enterochromaffin cells. The intensification of these changes depends on the after-operation period and typical features of an animal.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. A guinea pig, control. Duodenum. Enterochromaffin cells in Lieberkühn's crypts. Fast Red B. stain. Magn. ca 700 ×.

Fig. 2. A rat, control. Duodenum. The chromatin, stained after Feulgen, in the nuclei of enterochromaffin cells. Magn. ca 200 ×.

Fig. 3. A rat, control. Duodenum. PAS staining with Schiff's reagent for neutral mucopolysaccharides. Magn. ca 200 ×.

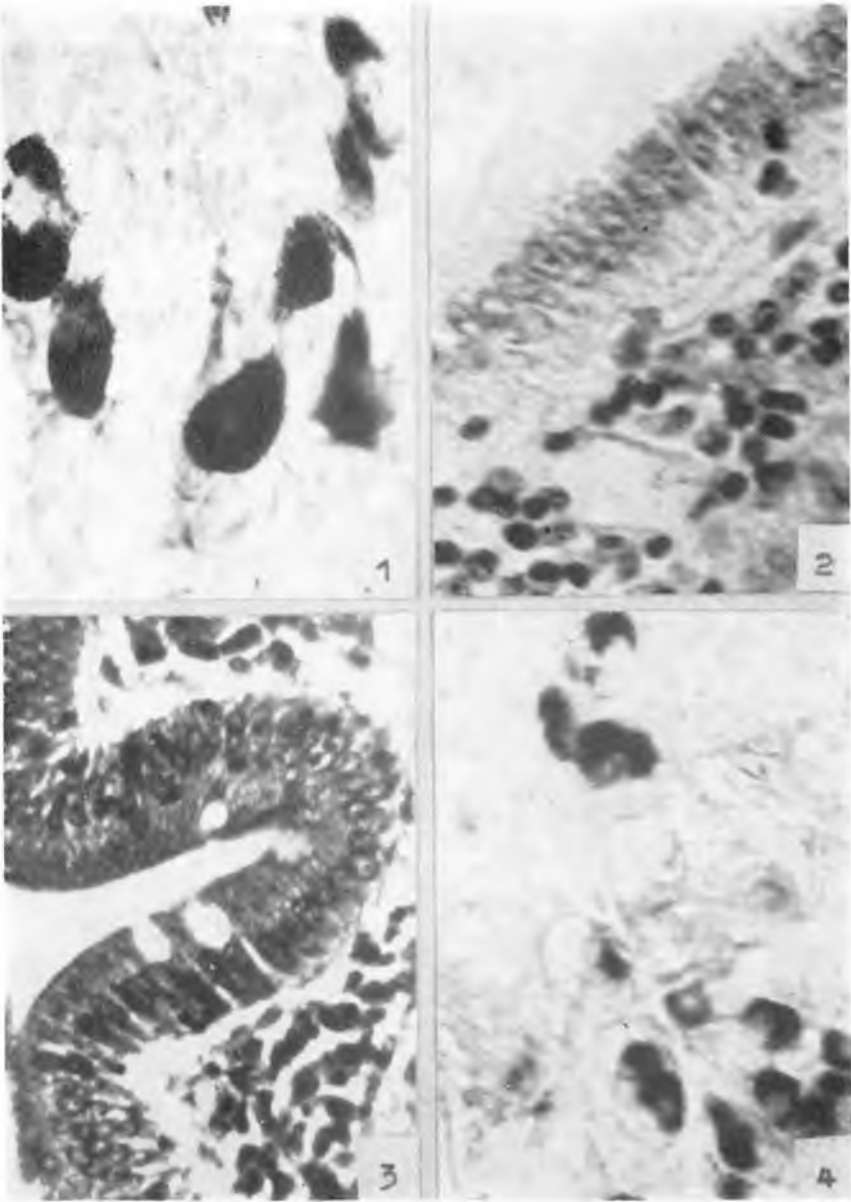
Fig. 4. A guinea pig, control. Duodenum. Groups of enterochromaffin cells in Lieberkühn's crypts. Fast Red B. stain. Magn. ca 400 ×.

Fig. 5. A rat, group I. Duodenum. RNA stained after Brachet. Magn. ca 700 ×.

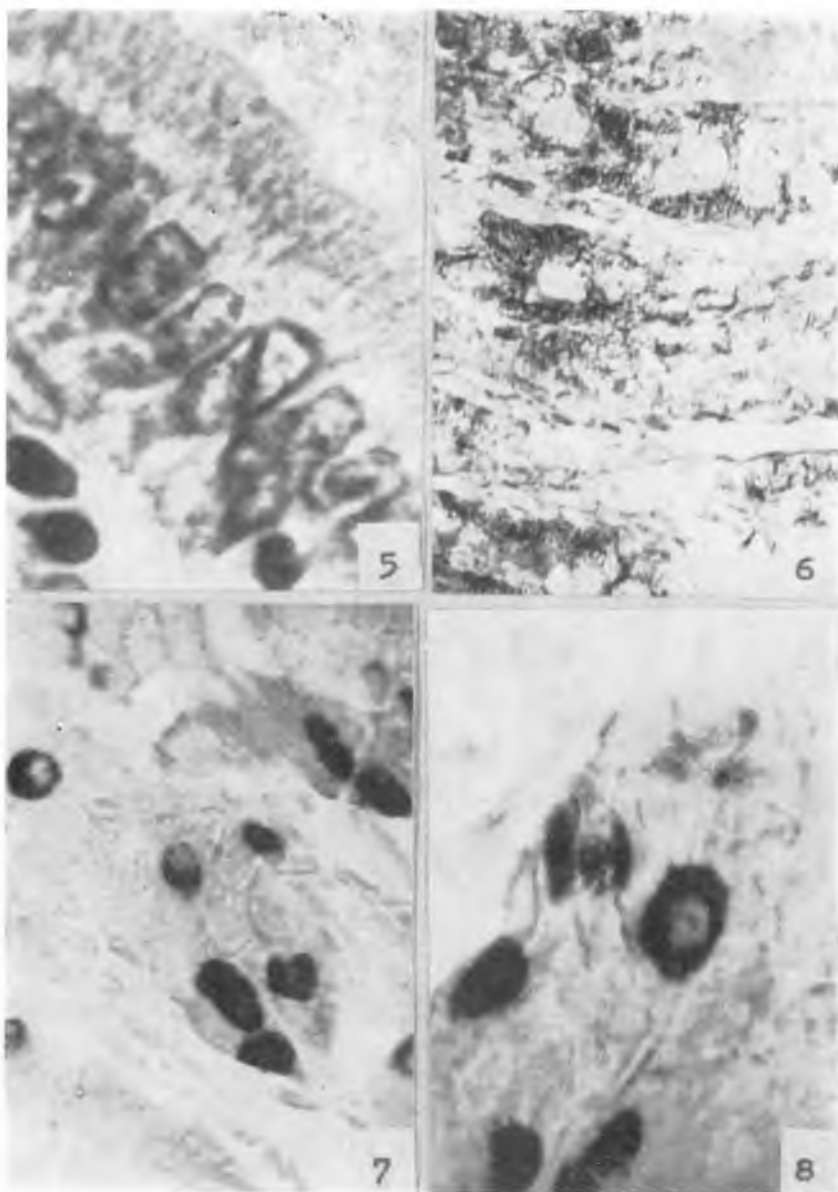
Fig. 6. A rat, group II. Duodenum. Uneven reaction to alkaline phosphatase. Gomori stain. Magn. ca 200 ×.

Fig. 7. A guinea pig, group III. Duodenum. Note the cells-shadows with traces of serotonin granules. Fast Red B. stain. Magn. ca 400 ×.

Fig. 8. A guinea pig, group VI. Duodenum. Enterochromaffin cells stained with Fast Red B., on the surface of villi. Magn. ca 700 ×.



Ryc. 1 - 4



Ryc. 5 — 8