

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXII, 26

SECTIO D

1967

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

Józef STASZYC i Irena KRÓLIKOWSKA-PRASAŁ

**Badania nad wpływem wagoTomii na odczyny histochemiczne komórek  
nabłonka i gruczołów dwunastnicy**

Studies of the Influence of Vagotomy on Histochemical Responses in the Epithelial  
Cells and Duodenal Glands

W dostępnej nam literaturze nie znaleźliśmy wyczerpujących prac o wpływie przecięcia nerwu błędnego na gruczoły jelitowe u małych zwierząt laboratoryjnych. Dlatego też celem naszej pracy jest zbadanie wpływu wagoTomii w odcinku brzusz-  
nym na niektóre reakcje enzymatyczne w komórkach gruczołowych.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania doświadczalne zostały przeprowadzone na szczurach białych, płciowo dojrzałych samcach, hodowli wsobnej. Zwierzęta były wszechstronnie i dobrze ży-  
wione (Kowalewski 1951). Szczury podzielono na 7 grup doświadczalnych. W każdej grupie było po pięć, przy czym u trzech przecinano nerwy błędne, zaś z dwóch pozostałych jeden był operowany „pozornie”, a drugi stanowił kontrolę. W znieczuleniu ogólnym eterowym otwierano jamę brzuszną i przecinano oba pnie nerwów błędnych na wysokości lewego i prawego kąta przelykowo-żołądkowego. Operacja „pozorna” technicznie przebiegała podobnie, nie dokonywano tylko wago-  
Tomii. Po zabiegu zwierzęta szybko powracały do zdrowia, nie różniąc się zachowa-  
niem od szczurów kontrolnych. Dwunastnice do badań pobierano jednocześnie z całej grupy w 12 godzin po ostatnim posiłku, w godzinach rannych, w następu-  
jących odstępach czasu po wagoTomii: grupa I w 30 dni od zabiegu, II w 2 mie-  
siące, III w 4, IV w 5, V po 8 miesiącach, VI po 12, a VII po 15 miesiącach. Wycinki z dwunastnicy do badań histochemicznych utrwalano w płynie Bakera i krajano na mikrotomie mrozeniowym. Do pozostałych prób utrwalano w płynach Carnoya i Gendre. Jako substratu dla fosfataz użyto  $\beta$ -glicerofosforanu sodu. Dla fosfatazy kwaśnej (ACP-azy) pH środowiska wynosiło 5,4, dla zasadowej (ALP-azy) pH = 9,4. Inkubację przeprowadzano w temperaturze 37°C w ciągu 1 godziny. Kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) oznaczano wg metody Feulgena, a rybonukleinowy (RNA) wg metody Bracheta. Swoistość reakcji na RNA spraw-

dzano rybonukleazą krystaliczną. Mukopolisacharydy obojętne wykazywano wg reakcji PAS z odczynnikiem Schiffa, a kwaśne wg metody Blooma i Kellego z błękitem astra. Trawienie skrawków przeprowadzano diastazą i dimedonem.

## BADANIA WŁASNE

### Grupa kontrolna

Jądra enterocytów nabłonka dwunastnicy oraz komórek wchodzących w skład gruczołów Lieberkühna i Brunnera dają odczyn wybiórczy Feulgena na DNA. Odczyn ten występuje w postaci gruboziarnistych skupisk na obwodzie i w strefie przyjąderkowej (ryc. 1). Cytoplazma i jąderka tych komórek zabarwione wg metody Bracheta wykazują silną pironinochłonność. Należy jednak zaznaczyć, że w komórkach gruczołów Lieberkühna RNA występuje zwykle w postaci delikatnych grudek i ziarenek, które są rozrzucone w cytoplazmie (ryc. 2). Podobne obrazy obserwuje się także w komórkach gruczołów Brunnera. W preparatach, na które działa się rybonukleazą, ziarnistości pironinochłonne nie występują (ryc. 3), co przemawia za tym, że istotnie zawierają one kwas rybonukleinowy (ryc. 4).

Największą aktywność substancji PAS dodatnich wykazuje rąbek oskórkowy i enterocyty. Mniej intensywne odczyny zauważono w mukocytach, komórkach Panetha oraz w zrębie łącznotkankowym kosmków. Substancje PAS pozytywne ulegają całkowitemu zablokowaniu dime-donem, a diastaza nie wywołuje zmian w ich obrazie. Barwienie na mukopolisacharydy kwaśne daje silne odczyny w mukocytach (ryc. 5).

Intensywny odczyn na fosfatazę zasadową umiejscowiony jest w rąbku oskórkowym i komórkach, przy czym jest on zlokalizowany w części szczytowej i w strefie Golgiego (ryc. 6). W komórkach gruczołów Lieberkühna reakcja na ten enzym nie jest tak intensywna, a jądra wykazują słabą i niestałą aktywność f. zas. Komórki części wydzielniczej gruczołów Brunnera wykazują wysoką aktywność na f. zas., przede wszystkim w strefie Golgiego. Zauważa się również fosfatazo dodatnie reakcje w śródbłonku naczyń błony śluzowej i podśluzowej.

Wykonane odczyny na fosfatazę kwaśną dają wyraźną reakcję enzymatyczną w enterocytach w postaci drobnych ziarenek. W mukocytach reakcje są niestałe (ryc. 7). W rąbku oskórkowym obserwuje się większą aktywność na ten enzym niż w cytoplazmie. Natomiast w komórkach gruczołów Lieberkühna i Brunnera odczyny są słabsze niż w nabłonku pokrywającym powierzchnie kosmków.

## Grupy doświadczalne po wagotomii

Po przecięciu nerwów błędnych nie obserwuje się zmian makroskopowych w wyglądzie błony śluzowej dwunastnicy. Zauważa się natomiast obniżenie napięcia mięśniowego ścian jelita i zrosty okołojelitowe.

Odczyn Feulgena w nabłonku walcowatym kosmków przypomina obrazy kontrolne (ryc. 8). W komórkach gruczołów Lieberkühna szczególnie grup II, III, IV i V ziarenka DNA są duże, rozmieszczone zarówno w chromocentrach, jak i pojedynczo po jądroplazmie. Większe jednak grudki DNA znajdują się raczej na obwodzie jądra. Zabarwienie pironinochłonnych struktur na preparatach pochodzących z grup III i IV wykazuje, że jąderka dają odczyn barwny słabszy w porównaniu z zabarwieniem tak cytoplazmy, jak i jąderek komórek kontrolnych. W gruczołach Brunnera grup I i II barwliwość cytoplazmy na RNA dokoła jądra komórkowego jest mała. Nierównomierne wybarwienie grudek i ziarenek RNA obserwuje się również w grupach V i VI zarówno w komórkach nabłonka, jak i gruczołach Lieberkühna. Natomiast gruczoły Brunnera nie wykazują odchyień w intensywności wybarwienia RNA. Po zadziałaniu rybonukleazą odczyn pironinochłonny zanika, co świadczy za tym, że istotnie opisywane struktury zawierają RNA. W gruczołach Lieberkühna grup I, II i III zauważa się więcej podziałów komórkowych niż u zwierząt kontrolnych i doświadczalnych pozostałych grup. Nie znajduje się figur mitotycznych w komórkach nabłonka pokrywającego kosmki jelitowe i w gruczołach Brunnera.

We wszystkich grupach doświadczalnych śluz daje pozytywne reakcje PAS oraz wybarwia się wg metody Blooma i Kellego, przy czym intensywność odczynów na mukopolisacharydy kwaśne w nabłonku i mukocytach w grupie I jest mniejsza aniżeli w materiale kontrolnym (ryc. 9). Stan ten obserwuje się również w przypadkach pochodzących z grupy II, a częściowo III i IV. W grupach V, VI i VII mukocyty wykazują najsilniejsze wybarwienie na mukopolisacharydy w strefie ponadjądrowej. We wszystkich grupach doświadczalnych komórki te mają zmienne położenie jądra i umiejscowienie kropli śluzu, co może wskazywać na różne fazy czynnościowe nawet w skupiskach komórek jednorodzących. Reakcje PAS-dodatnie w komórkach dna gruczołów Lieberkühna i Brunnera są podobnie intensywne i nie odbiegają od materiału kontrolnego (ryc. 10). Wybarwione substancje PAS-pozytywne nie zmieniają się pod wpływem diastazy i ulegają zablokowaniu dimedonem.

W 30 dni po zabiegu w rąbku oskórkowym aktywność enzymatyczna na fosfatazę zasadową jest mniejsza niż w materiale kontrolnym. Również i w nabłonku walcowatym reakcje fosfatazo dodatnie są nieco słabsze. W grupie doświadczalnej II zauważa się, że więcej ziarenek aktywnych lokalizuje się w enterocytach tuż pod rąbkiem oskórkowym

(ryc. 11). Pomimo spadku intensywności odczynów wysokość nabłonka i rąbka wydaje się być nie zmieniona. W grupach III i IV obniżyła się aktywność na fosfatazę zasadową w komórkach gruczołów Lieberkühna. Aktywność badanego enzymu w grupie V tak w komórkach nabłonka, jak i w rąbku przypomina stopień nasilenia obserwowany w poprzednich grupach doświadczalnych. Na preparatach z grup VI i VII śródbłonki naczyń błony śluzowej wykazują odczyny nierównomierne nawet w sąsiednich kosmkach.

W grupie doświadczalnej I odczyn na fosfatazę kwaśną w szczytowej części enterocytów jest mniejszy niż u zwierząt kontrolnych. W 60 dni po wagotomii zauważa się obniżenie aktywności enzymatycznej w komórkach gruczołów Lieberkühna i Brunnera (ryc. 12). W rąbku oskórkowym grup III, IV, V, VI i VII aktywność na tę fosfatazę jest większa niż w cytoplazmie komórek nabłonka walcowatego. W mukocytach natomiast obserwuje się nadal zmienne nasilenia odczynów na fosfatazę kwaśną, a w niektórych preparatach nawet jej całkowity brak.

#### WYNIKI BADAŃ I WNIOSKI

Czynność jelit zależy od układu autonomicznego i wegetatywnego. Układ autonomiczny stanowią sploty Auerbacha i Meissnera. Łączą się one z gałązkami nerwów błędnych i włóknami splotów nerwu współczulnego (Kr z e m i ń s k a 1935/36). Zakończenia nerwów błędnych wpływają bezpośrednio na gruczoły odźwiernikowe i błony śluzowej jelita cienkiego. Dokonując więc wagotomii, wpływamy bezpośrednio na wydzielanie komórek gruczołowych pochodzenia nerwowego i pośrednio na fazę hormonalną (B o o k i w s p. 1952, H a r r i s 1960, B e l o w s k i 1963, S t o i c a i w s p. 1967, P a p a h a g i i w s p. 1967).

Nie ocenialiśmy wpływu wagotomii do czasu, aż wyniki histochemiczne zwierząt pozornie operowanych były podobne do kontrolnych. W ten sposób chcieliśmy wyeliminować zmiany, które powstały pod wpływem samego urazu operacyjnego. Zabieg chirurgiczny wyzwolił impuls dla nerwów dośrodkowych układu nerwowego ośrodkowego i nerwów dośrodkowych układu wegetatywnego (D r e w s 1950), tym bardziej, że nie można oddzielić w ogóle w naszym eksperymencie udziału układu nerwowego od wpływu gruczołów dokrewnych (W i l l i a m s 1963) na czynność komórek nabłonka i gruczołów jelitowych (H a a s 1955).

Już w grupach doświadczalnych II, III, IV i V wystąpiły zmiany w zabarwieniu i rozmieszczeniu kwasów nukleinowych zarówno w cytoplazmie, w jądrze, jak i w jąderkach. Ten polimorfizm morfologiczno-fizjologiczny wg G r z y c k i e g o (1951) może wskazywać na zmiany metabolizmu komórek gruczołowych.

W 30 dni po przecięciu nerwów błędnych rozmieszczenie mukopolisacharydów obojętnych i kwaśnych było inne i wyraźnie zmienne niż spostrzegli to Zawistowski i Zielska (1960) w jelicie myszy po stanie niedocukrzenia. Zauważone przez nas zmiany cytomorfologiczne mukocytów wg Wojnara (1953) i innych mogą świadczyć o fazie czynnościowej komórki, w jakiej ona się znajduje w danej chwili. Dlatego też sądzimy, podobnie jak Kanwar (1962), że każdy mukocyt stanowi jednostkę autonomiczną i że wydzielanie śluzu przez te komórki nie jest zjawiskiem ciągłym, ale okresowym. Proces mucynogenezy nie jest gwałtowny, ale zachodzi stopniowo i z pewnymi przerwami. Uważamy, że zmiany w zachowaniu się mukopolisacharydów są wynikiem braku bodźców, ponieważ przecięcie nerwów błędnych przerwało wpływ ośrodkowego układu nerwowego. Po zabiegu powstała więc przewaga fazy hormonalnej nad bodźcami nerwowymi (Muren 1957, Konturek i Król 1967).

Stwierdzone w grupie doświadczalnej pierwszej po wagotomii zmiany aktywności na fosfatazę zasadową świadczą, że jest ona czułym wskaźnikiem stanów fizjologicznych (Grzycki 1953, Dominas 1960). Zmienione odczyny występowały głównie w rąbku oskórkowym, co dowodzić może, że wchłanianie zachodzi poprzez rąbek przy współudziale tej fosfatazy i że zostało ono zaburzone ubytkiem wpływu nerwu błędnego. Hugon i Borgers (1966, 1968) uważają, że fosfataza zasadowa w rąbku i szczytowej części komórek pochłaniających może być pochodzenia pinocytarnego i uzależniona jest od katabolizmu komórek absorbujących. W mukocytach reakcje na fosfatazę zasadową były ujemne. Można więc sądzić, że komórki te nie biorą udziału w procesach resorpcji.

Jeszcze w 60 dniu obserwacji utrzymywało się zmniejszenie odczynów na fosfatazę kwaśną, przede wszystkim w komórkach nabłonka powierzchniowego i gruczołowego. Ponieważ fosfataza kwaśna jest czynna w procesach fosforylacji i defosforylacji śródkomórkowej uważamy, że wagotomia spowodowała zmiany w procesach metabolicznych nabłonka jelitowego.

Zmiany odczynów DNA i RNA oraz aktywność fosfataz może wskazywać na wpływ wagotomii na syntezę ciał białkowych w komórkach gruczołowych i nabłonka. Współzależność ta wg Godlewskiego (1953) wynika być może z faktu, że fosfataza zasadowa jest zaangażowana w przemianie kwasów nukleinowych. Glikoza jest absorbowana przez komórki nabłonkowe jelita, następnie przetwarzana i magazynowana w postaci glikogenu. Przy transporcie cząsteczek przez błonę komórkową bierze udział fosfataza zasadowa. Stwierdziliśmy w naszym materiale doświadczalnym osłabienia intensywności reakcji na f. zas. i PAS, co wskazuje na wyczerpywanie się zmagazynowanego glikogenu,

będącego źródłem energii (Kędzia 1962). Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają sugestie Grzyckiego (1954), Haasa (1955), Stracka (1955), Dominas i wsp. (1955), że istnieje ścisły związek między wchłanianiem cukrów, białka, kwasów tłuszczowych i innych składników pokarmowych a lokalizacją i aktywnością fosfataz. Nie ulega wątpliwości, że obniżenie utlenienia komórkowego i zmniejszenie poziomu glikozy upośledza sprawność układu oksydoredukcyjnego, co prowadzi do zmniejszenia się aktywności enzymów (Baranowski 1963). Na podstawie otrzymanych wyników cytochemicznych oraz morfologicznych sądzimy, że przecięcie nerwów błędnych wpływa na procesy anaboliczne i kataboliczne zarówno komórek nabłonka jelitowego, jak i gruczołowego, co wywołuje zmiany czynnościowe oraz organiczne.

## PIŚMIENNICTWO

1. Baranowski T.: Podręcznik biochemii, PZWL, Warszawa 1963.
2. Belowski H.: Post. Hig. Med. Dośw. **17**, 507—547, 1963.
3. Book D. T., Chinn A. B., Beams A. J.: *Gastroenterology*, **20**, 458—463, 1952.
4. Dominas H., Korolczyk J., Niemierko W.: Proc. Fourth Intern. Confer. Biochem. Probl. Lipids, 90—96, 1957.
5. Dominas H.: *Folia Morphol.*, **3**, 241—243, 1960.
6. Drews R.: *Pol. Przegl. Chirurg.*, **38**, 873—878, 1956.
7. Godlewski H.: *Folia Morphol.*, **13**, 59—70, 1953.
8. Grzycki S.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sec. D.*, **6**, 297—322, 1951.
9. Grzycki S.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sec. D.*, **8**, 193—231, 1953.
10. Grzycki S.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sec. D.*, **9**, 69—88, 1954.
11. Haas J.: *Physiologie der Zelle, Gebr. Bornträger, Berlin* 1955.
12. Harris J., Miller C. M.: *Surgery* **47**, 569—570, 1960.
13. Hugon J., Borgers M.: *Cytochem.* **14**, 629—640, 1966.
14. Hugon J., Borgers M.: *Histochemie* **12**, 42—66, 1968.
15. Kanwar K. C.: *Cytologia*, **27**, 233—247, 1962.
16. Kędzia H.: *Folia Morphol.*, **13**, 487—496, 1962.
17. Kowalewski K. L.: *Izdat. Akad. Nauk SSSR, Moskwa* 1951.
18. Konturek S., Król W.: *Pol. Tyg. Lek.* **22**, 1701—1704, 1967.
19. Krzemińska J.: *Folia Morphol.*, **6**, 38—52, 1935—1936.
20. Muren A.: *Acta Chir. Scand.*, **112**, 98—106, 1957.
21. Papahagi P., Daschievici S., Papahai M.: *Chirurgia*, **16**, 429—434, 1967.
22. Stoica T., Avramescu S., Caba E., Voicu F., Teodorescu-Exarcu L., Lacrama V.: *Chirurgia*, **7**, 423—428, 1967.
23. Strack H.: *Biochem. Resorb. Physiol. Chemie*, **2**, 200—254, 1955.

24. Williams R. H.: Endokrynologia, PZWL, Warszawa 1964.
25. Wojnar J. A.: Biologiczeskaja rol mikroelementow w organizmie żywotnych i człowieka. Miedgiz, 1953.
26. Zawistowski S., Zielska T.: Folia Morphol., 11, 93—99, 1960.

Pracę otrzymano 31 XII 1967

#### OBJASNIENIA DO RYCIN

Ryc. 1. Szczur kontrolny. Gruboziarnisty odczyn Feulgena w enterocytach. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 2. Szczur kontrolny. Odczyn RNA w gruczołach Lieberkühna. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 3. Szczur kontrolny. Stan po wytrawieniu RNA rybonukleazą krystaliczną. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 4. Szczur kontrolny. Wybarwienie RNA wg metody Bracheta. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 5. Szczur kontrolny. Odczyn na mukopolisacharydy kwaśne w komórkach kubkowych. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 6. Szczur kontrolny. Odczyn na fosfatazę zasadową w rąbku oskrórkowym i nabłonku. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 7. Szczur kontrolny. Wyraźne odczyny fosfatazy zasadowej w enterocytach. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 8. Szczur 30 dni po wagotomii. Odczyn Feulgena w gruczołach Lieberkühna i Brunnera. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 9. Szczur 30 dni po wagotomii. Osłabienie odczynu na mukopolisacharydy kwaśne. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 10. Szczur po wagotomii 60 dni. Reakcja PAS-dodatnia w gruczołach dwunastnicy. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 11. Szczur po wagotomii 60 dni. Odczyn na fosfatazę zasadową lokalizuje się przede wszystkim w enterocytach. Pow. ca 480 ×.

Ryc. 12. Szczur po wagotomii 60 dni. Zmniejszenie aktywności enzymatycznej na fosfatazę kwaśną w gruczołach dwunastnicy. Pow. ca 480 ×.

#### **Влияние ваготомии на гистохимические реакции клеток эпителия и желез двенадцатиперстной кишки**

#### **Резюме**

После ваготомии у белых крыс стволов обоих блуждающих нервов ниже диафрагмы в течение 15 месяцев из двенадцатиперстной кишки брался материал, в котором проводились гистохимические исследования фосфатазы, нейтральных и кислых мукополисахаридов, а также нуклеиновых кислот. На основании полученных результатов авторы приходят к заключению, что ваготомия влияет отрицательно на клеточный метаболизм эпителия и кишечных желез.

## Studies of the Influence of Vagotomy on Histochemical Responses in the Epithelial Cells and Duodenal Glands

### Summary

The authors performed bilateral vagotomy below the diaphragm in white rats. Sections obtained by them from the duodenum served as experimental material on which histochemical examinations were carried out for a period of 15 months. The histochemical studies concerned phosphatases, neutral and acid mucopolysaccharides and nucleic acids. According to the authors vagotomy has a negative influence on the cellular metabolism of the epithelial and duodenal glands.

### EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Control rat. Positive Feulgen's reaction in the enterocytes. Magn. ca. 480 X.

Fig. 2. Control rat. RNA response in Lieberkühn's glands. Magn. ca. 480 X.

Fig. 3. Control rat. Sections after treatment with RNA crystalline ribonuclease. Magn. ca. 480 X.

Fig. 4. Control rat. RNA staining according to Brachet. Magn. ca. 480 X.

Fig. 5. Control rat. Response to acid mucopolysaccharides in goblet cells. Magn. ca. 480 X.

Fig. 6. Control rat. Response to alkaline phosphatase in the brush border and in the epithelium. Magn. ca. 480 X.

Fig. 7. Control rat. Distinct response to alkaline phosphatase in the enterocytes. Magn. ca. 480 X.

Fig. 8. A rat after 30 days of vagotomy. Feulgen's reaction in Lieberkühn's glands and duodenal glands. Magn. ca. 480 X.

Fig. 9. A rat after 30 days of vagotomy. A decrease in the response to acid mucopolysaccharides. Magn. ca. 480 X.

Fig. 10. A rat after 60 days of vagotomy. PAS positive response in duodenal glands. Magn. ca. 480 X.

Fig. 11. A rat after 60 days of vagotomy. Response to alkaline phosphatase, mainly in the enterocytes. Magn. ca. 480 X.

Fig. 12. A rat after 60 days of vagotomy. A decrease in the enzymatic activity to acid phosphatase in duodenal glands. Magn. ca. 480 X.









