

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXVIII, 13

SECTIO D

1973

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

Grażyna RZESZOWSKA,
Barbara CISZEWSKA-POPIOŁEK

**Badania histochemiczne nad wpływem podawania metanabolu w ciąży
na różnicowanie się nabłonka jelita cienkiego
u zarodków szczurów białych**

Гистохимические исследования влияния подания препарата Metanabol во время
беременности на дифференцирование эпителия тонкой кишки у эмбрионов
белых крыс

Histochemical Research on the Effect of Administering Metanabol During Pregnancy
on the Differentiation of the Small Intestine Epithelium in the Embryo
of a White Rat

Udowodnione jest, że hormony stanowią jeden z podstawowych czynników teratogennych ((Piotrowski, 6). Łożysko pośredniczy w wymianie metabolicznej między matką i płodem, a działanie hormonów płciowych na zarodek uwarunkowane jest ich wpływem na ten narząd. Istnieją sugestie, że powodują one albo zmiany wsteczne albo rozrostowe, zaburzając tym samym przepuszczalność bariery łożyskowej (Misiewicz, 5). Działanie hormonów na komórki jest bardzo specyficzne. Dany hormon powoduje w tym samym organizmie w zależności od rodzaju tkanki czy narządu reakcje anaboliczne lub kataboliczne, względnie nie przejawia żadnej czynności. Nie jest dotychczas znane, w jakim stopniu hormony płciowe podawane samicom ciężarnym mogą wpływać na procesy różnicowania się nabłonka jelitowego płodów. Podjęliśmy badania mające na celu wykazanie aktywności fosfatazy zasadowej, fosfatazy kwaśnej, dehydrogenazy glutaminowej, glikogenu, kwaśnych mukopolisacharydów w nabłonku jelita cienkiego zarodków, których matki otrzymywały od drugiego dnia ciąży metanabol (pochodna metylotestosteronu). Obserwacje przeprowadzono w 19 dniu życia płodowego, ponieważ jest to okres przełomowy w różnicowaniu się morfologicznym i czynnościowym jelita u szczurów.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzono na 60 zarodkach szczurów białych z hodowli własnej Zakładu. Dzień, w którym stwierdzono obecność czopa pochwowego, przyjmowano

za pierwszy dzień ciąży. Samice ciężarne podzielono na 2 grupy: I — kontrolna (10 samic) oraz II — doświadczalna (20 samic), w której podawano samicom codziennie począwszy od 2 dnia ciąży metanabol (produkcji Jeleniogórskich Zakładów Farmaceutycznych — Polfa) w dawce 0,05 mg dla jednego szczura, tzn. 0,33 mg/kg. Obie grupy otrzymywały przez cały czas trwania ciąży pełnokaloryczną dietę z odpowiednią ilością białka, witamin i soli mineralnych. Szczury dekapitowano 19 dnia ciąży. Od każdego pobierano 2 zarodki, z których wypreparowywano jelito czcze. W pobranym materiale wykrywano obecność fosfatazy zasadowej, fosfatazy kwaśnej, dehydrogenazy glutaminowej, glikogenu i kwaśnych mukopolisacharydów.

Badania enzymatyczne przeprowadzano na tkankach utrwalonych w zimnym płynie Bakera i na skrawkach świeżych grubości ok. 10 μ krojonych na mikrotomie mrozeniowym. Fosfatazy zasadową i kwaśną wykrywano wg metody sprzęgania z barwnikami dwuazowymi. Dehydrogenazę glutaminową wg metody Pearse'a. Glikogen wykrywano w skrawkach parafinowych utrwalonych w płynie Carnoya, barwionych karminem Besta. Jądra komórkowe podbarwiano hematoksyliną. Kwaśne mukopolisacharydy utrwalano w mieszaninie 95% alkoholu i formolu obojętnego w stosunku 9 : 1 i barwiono błękitem alcjanowym.

OBSERWACJE HISTOCHEMICZNE

F o s f a t a z a z a s a d o w a

Grupa kontrolna

W wysokich, walcowatych komórkach nabłonka jelita cienkiego obserwowano wyraźnie drobnoziarnisty produkt reakcji na fosfatazę zasadową. Najsilniejszy odczyn enzymatyczny występował w rąbku szczoteczkowym. Ziarenek fosfatazo-dodatnich było więcej w okolicy nadjądrowej w porównaniu z częścią przypośrednią komórek. Pozytywną reakcję enzymatyczną wykazywały również otoczki wakuoli śródkomórkowych (ryc. 1). Odczyn na fosfatazę zasadową w jądrach komórkowych należy uważać za niespecyficzny.

Grupa doświadczalna

Nie uchwycono różnic w aktywności i lokalizacji fosfatazy zasadowej w porównaniu z grupą kontrolną.

F o s f a t a z a k w a ś n a

Grupa kontrolna

W 19 dniu życia zarodka intensywny odczyn na fosfatazę kwaśną występował w rąbku szczoteczkowym, a także w graniczącej z nim cytoplazmie. Reakcja w rąbku szczoteczkowym była tak silna, że nie można tu rozróżnić poszczególnych ziarenek, natomiast w obrębie pozostałej cytoplazmy obserwowano drobne, nieliczne ziarnistości. W części przypośredniej niektórych komórek nabłonka ziarenek było więcej w porównaniu z cytoplazmą ponadjądrową.

Grupa doświadczalna

Odczyn na fosfatazę kwaśną w rąbku szczoteczkowym i w szczytowej części cytoplazmy był intensywny, podobnie jak w grupie kontrolnej. Nie obserwowano tu różnicy w nasileniu reakcji enzymatycznej między częścią przypodstawną i ponadjądrową komórek nabłonka jelitowego. Ziarenka świadczące o obecności enzymu gęsto wypełniały cytoplazmę (ryc. 2).

Dehydrogenaza glutaminowa

Grupa kontrolna

Odczyn na dehydrogenazę glutaminową występował w postaci ziarenek, które obficie układały się zarówno w części szczytowej, jak i przypodstawnej komórek nabłonka. W wielu kosmkach komórki pokrywające ich wierzchołki wykazywały silniejszą reakcję enzymatyczną od pozostałych. Bardzo słabą aktywność dehydrogenazy glutaminowej obserwowano w komórkach nabłonkowych w zagłębieniach międzykosmkowych.

Grupa doświadczalna

W nabłonku kosmków jelitowych obserwowano szereg komórek z mniejszym odczynem enzymatycznym w porównaniu z kontrolą. Nabłonek wierzchołkowych odcinków kosmków, podobnie jak w grupie poprzednio opisaney, wykazywał wyraźną aktywność na dehydrogenazę glutaminową. W komórkach leżących w zagłębieniach międzykosmkowych, obserwowano bardzo słabą reakcję enzymatyczną względnie były zupełnie jej pozbawione (ryc. 3).

Glikogen

Grupa kontrolna

Najsilniejsza reakcja barwna z karminem Besta występowała w rąbku szczoteczkowym komórek nabłonka jelitowego. Cytoplazma zawierała drobne, równomiernie rozmieszczone ziarenka, świadczące o obecności glikogenu (ryc. 4).

Grupa doświadczalna

W porównaniu z grupą kontrolną nie uchwycono różnic w odczynie na glikogen.

Kwaśne mukopolisacharydy

Grupa kontrolna

Delikatną reakcję z błękitem alcjanowym obserwowano w rąbku szczoteczkowym nabłonka jelitowego. Intensywny odczyn barwny uzyskano w komórkach kubkowych, z których część przybrała już typowy dla siebie kształt, natomiast inne miały jeszcze zwężoną część wierzchołkową, a rozszerzały się w kierunku podstawy.

Grupa doświadczalna

Nie wykazano różnic w reakcji barwnej z błękitem alcjanowym w porównaniu z kontrolną.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

W różnicowaniu się nabłonka jelitowego u szczura rozróżnia się kilka faz, a wśród nich okres od 19 dnia życia płodowego do urodzenia, który cechuje się już znacznym stopniem dojrzałości morfologicznej i enzymatycznej. Należy jednak podkreślić, że ostateczne zróżnicowanie jelita następuje w 3—4 tygodnie po urodzeniu (V o l l r a t h, 12). U 19-dniowego zarodka szczura obserwuje się wyraźne kosmki pokryte nabłonkiem jednowarstwowym walcowatym posiadającym zdolności resorbcyjne. Wzrasta aktywność enzymów w komórkach nabłonka począwszy od 19 dnia życia płodowego — co przynajmniej częściowo jest uwarunkowane zwiększoną czynnością przysadki mózgowej i nadnerczy (V o l l r a t h, 12). Nie można tu pominąć wpływu hormonów matki na kształtowanie się układów enzymatycznych płodu.

Moment urodzenia i rozpoczęcia samodzielnego przyjmowania pokarmów wpływa decydująco na skład enzymatyczny jelita. W przeprowadzonym przez nas eksperymencie podawaliśmy samicom ciężarnym metanabol, który pobudza anabolizm białek, a jego działanie androgenne jest o wiele słabsze od testosteronu (S u p n i e w s k i, 10). Testosteron wzmacnia aktywność szeregu enzymów, umożliwiając zwiększone wykorzystanie azotu do budowy białka (Ż a k, 13, T a r n a w s k i, 11). Rozpatrując zachowanie się fosfatazy zasadowej w komórkach nabłonka jelita u zarodków szczurów z 19 dnia rozwoju, których matki od początku ciąży otrzymywały metanabol nie zauważono różnic w zestawieniu z kontrolą. L e v i w s p. (4), obserwując fosfatazę zasadową w jelicie cienkim człowieka od 7 do 22 tygodnia ciąży stwierdzają, że w miarę różnicowania się kosmków wzrosła jej aktywność oraz to, że komórki leżące na wierzchołkach kosmków wykazują silniejszą reakcję enzymatyczną niż te, które leżą w zagłębieniach międzykosmkowych. Nie obserwowaliśmy tego zjawiska w nabłonku jelitowym zarodków szczurów odnośnie fosfatazy zasadowej.

Reakcja na fosfatazę kwaśną w rąbku szczoteczkowym i cytoplazmie szczytowych części komórek nabłonka była podobna w grupach: kontrolnej i doświadczalnej. Natomiast pozostały obszar cytoplazmy w grupie doświadczalnej zawierał więcej ziarenek świadczących o obecności fosfatazy kwaśnej w porównaniu z kontrolą. Może to być wynikiem „aktywacji lizosomów”, co ma bezpośrednie powiązanie z funkcją resorpcyjną nabłonka jelitowego. W toku powstawania nabłonka jednowarstwowego obserwuje się proces obumierania komórek, który pozostaje także w ści-

słym związku ze wzmożoną aktywnością enzymów lizosomalnych (B a x t e r - G r i l l o, 1). Wykształcenie się nabłonka jednowarstwowego jest bardzo istotne, ponieważ pozwala na bezpośredni kontakt komórek zarówno z naczyniami krwionośnymi, jak i ze światłem jelita.

Jelito płodowe nabiera zdolności resorpcyjnych począwszy od 19 dnia rozwoju. Świadczą o tym obserwacje zjawiska pinocytozy, która wyraźnie wzrasta właśnie w 19 dniu życia płodowego (V o l l r a t h, 12). H u g o n (2) opisał wzmożoną pinocytozę w komórkach nabłonka jelitowego u myszki trwającą aż do urodzenia. Nasze badania wykazują, że w grupie zwierząt doświadczalnych nastąpiło niewielkie zahamowanie reakcji na dehydrogenazę kwasu glutaminowego w komórkach nabłonka leżącego poniżej wierzchołka kosmków. Może to świadczyć o czynnym reagowaniu nabłonka jelitowego na przestrojenie hormonalne. Dehydrogenaza glutaminowa, której działanie zespała się z procesem asymilacji azotu i regulacji cyklu Krebsa, jest enzymem wrażliwym na działanie hormonów, estrogennych, androgennych, progesteronu, które powodują dysocjację enzymu na podjednostki, a tym samym hamują jego aktywność (R o g u l s k i, 9).

W odczynie na glikogen nie zauważyliśmy różnicy między grupą kontrolną i doświadczalną. W obydwu grupach rąbek szczoteczkowy i ziarenka cytoplazmatyczne wykazywały reakcję z karminem Besta.

Kwaśne mukopolisacharydy wykazane przy pomocy błękitu alcjanowego zachowywały się podobnie w grupie kontrolnej i doświadczalnej. W 17 i 18 dniu rozwoju pojawiają się w nabłonku jelitowym komórki kubkowe, a w związku z gromadzeniem się śluzu i gotowością wykonywania czynności wydzielniczej większość z nich przybiera charakterystyczny kształt w 19 dniu życia płodowego.

Podobną lokalizację glikogenu w komórkach i ich reakcję na kwaśne mukopolisacharydy opisała K o n o p a c k a (3), w równoległym stadium rozwojowym jelita świni. Autorka podkreśla jednak, że w momencie wyróżnicowania się kosmków komórki leżące na ich wierzchołkach zawierają więcej glikogenu i polisacharydów niż w środkowych dolnych odcinkach.

R o g ó y s k i (8) badając działanie dianabolu wykazał ochronny jego wpływ na płody myszek ciężarnych poddanych głodzeniu przy jednoczesnym stosowaniu subteratogennych i teratogennych dawek octanu hydrokortyzonu. Trzeba dodać, że autor nie zauważył ochronnego działania dianabolu w przypadkach, gdy samice ciężarne były poddawane tylko głodzeniu. Zwierzęta używane w naszym doświadczeniu otrzymywały pełnowartościową dietę. Ograniczenie spożywanego pokarmu samicom ciężarnym i równocześnie podawanie np. octanu hydrokortyzonu zwiększa

sza możliwość występowania zaburzeń rozwojowych płodów (Rogóyski, 7).

Reasumując otrzymane przez nas wyniki badań histochemicznych okazało się, że metanabol spowodował aktywację lizosomów, wyrażającą się wzrostem reakcji na fosfatazę kwaśną i zahamowanie odczynu na dehydrogenazę kwasu glutaminowego w niektórych komórkach nabłonka jelitowego.

PIŚMIENICTWO

1. Baxter - Grillo D. L.: *Histochemie* 21, 268—276, 1970.
2. Hugon J. S.: *Histochemie* 22, 109—124, 1970.
3. Konopacka B.: *Fol. Morph.* 10, 1—8, 1959.
4. Lev R., Siegel H. I., Bartman J.: *Histochemie* 29, 103—119, 1972.
5. Misiewicz L.: *Post. Hig. Med. Dośw.* 22, 855—909, 1968.
6. Piotrowski J.: *Endokr. Pol.* 21, 175—179, 1970.
7. Rogóyski A.: *Fol. Morph.* 26, 343—350, 1967.
8. Rogóyski A.: *Fol. Morph.* 28, 563—570, 1969.
9. Rogulski J.: *Postępy Biochem.* 12, 35—62, 1966.
10. Supniewski J.: *Post. Hig. Med. Dośw.* 20, 145—152, 1966.
11. Tarnawski R., Żak T.: *Endokr. Pol.* 21, 439—443, 1970.
12. Vollrath L.: *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte. Springer-Verlag* 41, 7—67, 1969.
13. Żak T., Jóźwiakiewicz S., Tarnawski R., Adamska A.: *Endokr. Pol.* 22, 49—54, 1971.

Otrzymano 20 II 1973.

OBJAŚNIENIA DO RYCIŃ

Ryc. 1. Fosfataza zasadowa w komórkach nabłonka jelita cienkiego zarodka z grupy kontrolnej. Mikroskop Lumipan C. Zeiss Jena. Pow. ok. 350 X.

Ryc. 2. Fosfataza kwaśna w komórkach nabłonka jelita cienkiego zarodka z grupy doświadczalnej. Mikroskop Lumipan C. Zeiss Jena. Pow. ok. 350 X.

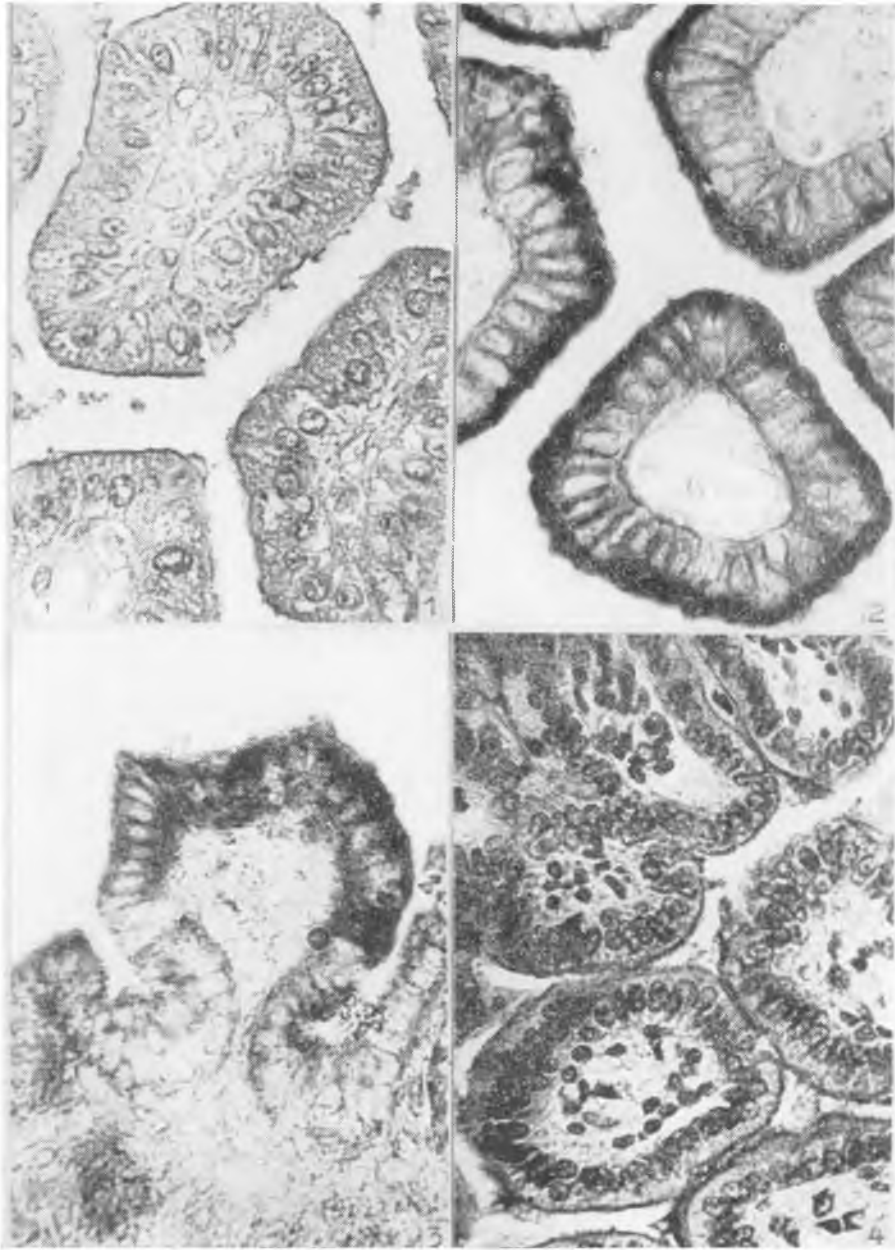
Ryc. 3. Dehydrogenaza glutaminowa w komórkach nabłonka jelitowego zarodka z grupy doświadczalnej. Mikroskop Lumipan C. Zeiss Jena. Pow. ok. 350 X.

Ryc. 4. Glikogen w komórkach nabłonka jelitowego zarodka z grupy kontrolnej. Mikroskop Lumipan C. Zeiss Jena. Pow. ok. 350 X.

РЕЗЮМЕ

Проследили активность щелочной фосфатазы, кислой фосфатазы, глутаминовой дегидрогеназы, гликогена и кислых мукополисахаридов в эпителии тонкой кишки 19-дневных эмбрионов, матери которых получали со второго дня беременности Metanabol (Polfa).

Заметили, что у опытных животных повысилась реакция на кислую фосфатазу и затормозилась реакция на глутаминовую дегидрогеназу в некоторых клетках эпителия тонкой кишки.



Grażyna Rzeszowska, Barbara Ciszewska-Popiołek

SUMMARY

The activity of alkaline phosphatase, acid phosphatase, glutaminase dehydrogenases, glycogen and acid mucopolysaccharides in the small intestine epithelium of 19 day old embryos, whose mothers received Metanabol (Polfa) from the second day of pregnancy. It was observed that in experimental animals the reaction to acid phosphatase increased and that the reaction to glutaminase dehydrogenases was inhibited in some of the intestine epithelium cells.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Alkaline phosphatase in the small intestine epithelium cells of an embryo from the control group. Microscope Lumipan C. Zeiss Jena. enlargement about 350 X.

Fig. 2. Acid phosphatase in the small intestine epithelium cells of an embryo the experimental group. Microscope Lumipan C. Zeiss Jena. enlargement about 350 X.

Fig. 3. Glutaminase dehydrogenase in the intestine epithelium of an embryo from the experimental group. Microscope Lumipan C. Zeiss Jena. enlargement about 350 X.

Fig. 4. Glycogen in the intestine epithelium cells of an embryo from the control group. Microscope Lumipan C. Zeiss Jena. enlargement about 350 X.

