

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXXIV, 42

SECTIO D

1979

Zakład Histologii i Embriologii. Instytut Biologiczno-Morfologiczny. Wydział Lekarski.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Józef Staszyc

Tamara MAJSTRUK-MAJEWSKA, Jerzy TARACH,
Włodzimierz MATYSIAK,
Jadwiga ROMANOWSKA-SARLEJ,
Wiesława ZARANKO

**Badania histochemiczne nad wpływem Bencyliny-1* na układ trawienny
zwierząt doświadczalnych**

Гистохимические исследования влияния Бенцилины-1 на пищеварительный тракт
экспериментальных животных

Histochemical Research on the Effect of Bencylina-1 upon the Digestive System
of Experimental Animals

Doświadczenia nasze miały na celu przebadanie wpływu wymienionego antybiotyku na morfologię oraz reakcje histochemiczne w układzie trawiennym zwierząt doświadczalnych. Bencylina-1 bowiem posiada działanie przeciwbakteryjne zbliżone do penicylin grupy izoksalilowej, głównie w stosunku do grupy *Staphylococcus* i *Yersinia*, *Pseudotuberculosis* i *B. subtilis* oraz wielu innych (1, 8).

Toksyczność ostra Bencyliny-1 LD 50, po podaniu dożylnym myszom, wynosi 640 mg/kg (przedział 596,7—686,4).

MATERIAŁ I METODYKA

Do badań użyto 100 szczurów białych (samców) szczepu Wistar o c.c. 150—160 g oraz 50 myszy białych (samców) o c.c. 20—25 g. Zwierzęta podzielono na 18 grup: 12 grup doświadczalnych liczących po 10 zwierząt i 6 grup kontrolnych, z których każda zawierała 5 osobników (tab. 1).

Doświadczenie przebiegało w dwu etapach — badano zwierzęta poddane toksyczności podostrej, po 6 tygodniach codziennego podawania leku (seria A i C) oraz poddane toksyczności przewlekłej, po 3 miesiącach codziennego podawania leku (seria B i D). Bencylinę-1 podawano szczurom dootrzewnowo (i.p.) i dożołądkowo

* Związek ten znajduje się w fazie laboratoryjnych opracowań Tarchomińskich Zakładów Farmaceutycznych „Polfa”.

(p.o.), myszy otrzymywały lek jedynie dootrzewnowo (i.p.). Szczurom wstrzykiwano maksymalnie 0,5 ml roztworu leku na 100 g c.c., natomiast myszom 0,01 ml roztworu na 1 g c.c.

Sporządzony roztwór leku przy dawce podawanej i.p. 10 mg/kg dla szczurów był 0,2%, przy dawce 30 mg/kg — 0,6%. Przy podawaniu p.o. 100 mg/kg — 2%, przy dawce 400 mg/kg — 8%. U myszy przy dawce 20 mg/kg stosowano roztwór 0,2%, przy 60 mg/kg — 0,6%. Grupy zwierząt kontrolnych otrzymywały w tych samych warunkach sam rozpuszczalnik (woda destylowana). Wysokość dawek w poszczególnych grupach oraz drogę ich podawania zestawiono w tab. 1.

Tabela 1

Toksyczność podostra (6 tyg.)				Toksyczność przewlekła (3 mies.)		
Seria A — szczury				Seria B — szczury		
Numer grupy	dawka mg/kg	liczba zwierząt	droga podawania	dawka mg/kg	liczba zwierząt	droga podawania
I	10	10	dootrzew.	10	10	dootrzew.
II	30	10	dootrzew.	30	10	dootrzew.
III	kontr.	5	dootrzew.	kontr.	5	dootrzew.
IV	100	10	dożołądk.	100	10	dożołądk.
V	400	10	dożołądk.	400	10	dożołądk.
VI	kontr.	5	dożołądk.	kontr.	5	dożołądk.
Seria C — myszy				Seria D — myszy		
I	20	10	dootrzew.	20	10	dootrzew.
II	60	10	dootrzew.	60	10	dootrzew.
III	kontr.	5	dootrzew.	kontr.	5	dootrzew.

Zwierzęta dekapitowano i pobierano do badań wycinki żołądka, dwunastnicy i jelita czczego. Materiał utrwalano w 10% formolu i w płynie Bakera, a wycinki nie utrwalone krojone były w kriostacie.

Skrawki poddano następującym testom histologicznym i histochemicznym: barwieniu hematoksyliną i eozyną, ujawnianiu aktywności fosfatazy zasadowej i fosfatazy kwaśnej metodą Gomoriego, ujawnianiu aktywności lipazy wg metody Gomoriego i Takamatsu, dehydrogenazy bursztynianowej wg metody Nachlasy i wsp. oraz barwieniu lipidów obojętnych wg metody Lisona i Dagnelie'a.

Mikrofotografie wykonano przy pomocy aparatu fotograficznego Exacta Varex 1000.

WYNIKI BADAŃ

ZOŁĄDEK

Barwienie hematoksyliną i eozyną (H+E)

U zwierząt serii A (toksyczność podostra) nie zaobserwowano żadnych zmian w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Odczyny barwne elementów komórkowych i układ morfologiczny błon żołądka były prawidłowe. U szczurów doświadczalnych serii B (toksyczność przewlekła) oraz u myszy serii C (toksyczność podostra) i D (toksyczność przewlekła) zau-

ważono przekrwienie ściany żołądka, szczególnie w błonie śluzowej i podśluzowej, oraz poszerzenie naczyń krwionośnych i pojedyncze wynaczynienia.

Fosfataza zasadowa (FZ)

Żołądek u szczurów serii A (doświadczalnych i kontrolnych) wykazywał jednakowy odczyn na badany enzym (ryc. 1). Lokalizował się on szczególnie w dolnych odcinkach gruczołów żołądkowych jak również w nabłonku w postaci drobnoziarnistej. U zwierząt serii B, zwłaszcza po podaniu leku p.o., nastąpiło obniżenie aktywności FZ w gruczołach oraz prawie zupełny zanik w nabłonku wyściełającym błonę śluzową (ryc. 2). Reakcja enzymatyczna w żołądku myszy doświadczalnych (seria C i D) nie różniła się od kontrolnej.

Fosfataza kwaśna (FK)

Enzym ten w żołądku zwierząt doświadczalnych wszystkich grup doświadczalnych i kontrolnych wykazywał podobną aktywność i lokalizację. We wszystkich typach komórek gruczołów lizosomy, których markerem jest FK, występowały na terenie cytoplazmy w ilości umiarkowanej.

Dehydrogenaza bursztynianowa (BDH)

Zarówno u szczurów, jak i u myszy poddanych toksyczności podostrej i przewlekłej oraz u zwierząt kontrolnych odczyn na BDH był podobny. Szczególną aktywność wykazywały komórki okładzinowe, nieco mniejszą — inne typy komórek blaszki śluzowej właściwej.

DWUNASTNICA

Barwienie hematoksyliną i eozyną (H+E)

U wszystkich badanych osobników nie stwierdzono żadnych różnic w porównaniu z preparatami kontrolnymi.

Fosfataza zasadowa (FZ)

U badanych osobników zaznaczyły się różnice w aktywności FZ. Prawidłowy obraz lokalizacji (drobnoziarnisty odczyn w rąbku szczoteczkowym nabłonka dwunastnicy) występował u szczurów serii B oraz u myszy serii C. U szczurów serii A, w grupach otrzymujących lek p.o. stwier-

dzono podwyższoną aktywność enzymu. U myszy doświadczalnych serii D natomiast wystąpiło osłabienie odczynu w rąbku szczoteczkowym nabłonka oraz ogniskowo — zupełny brak reakcji enzymatycznej w ścianie dwunastnicy.

Fosfataza kwaśna (FK)

Aktywność enzymu w grupach zwierząt kontrolnych (postać drobnziarnista) zlokalizowana była przede wszystkim w nabłonku pokrywającym kosmki jelitowe (ryc. 3). Podobnie przedstawiał się odczyn u osobników serii B. Zwiększenie aktywności FK (lizosomów) obserwowano zarówno w nabłonku pokrywającym kosmki, jak i wyściełających gruczoły Brunnera i Lieberkühna u szczurów serii A otrzymujących lek dożołądkowo (ryc. 4). U myszy obu serii (C i D) wystąpiło obniżenie aktywności FK w nabłonku lub ogniskowe osłabienie odczynu w ścianie narządu.

Lipaza

Enzym ten lokalizował się przede wszystkim w nabłonku pokrywającym kosmki jelitowe. Aktywny odczyn stwierdzono w cytoplazmie wokół jąder komórkowych. Obraz taki obserwowano we wszystkich grupach zwierząt kontrolnych oraz doświadczalnych, z wyjątkiem szczurów serii B, po podaniu leku p.o. U tych ostatnich uwidaczniało się obniżenie aktywności lipazy. Drobne, niezbyt gęsto układające się ziarnistości, lokalizowały się w nabłonku ponad jądrami komórkowymi. Występowały również w niewielkiej ilości w zrębie kosmków jelitowych.

Dehydrogenaza bursztynianowa (BDH)

Grupy kontrolne i doświadczalne serii A wykazywały normalną aktywność i lokalizację enzymu. W nabłonku dwunastnicy grube ziarna formazanu wypełniały całkowicie cytoplazmę komórek. U szczurów serii B (po podaniu leku dożołądkowo) oraz u myszy serii C i D, w 60% preparatów obserwowano osłabienie aktywności badanego enzymu. Lokalizacja natomiast badanych struktur pozostawała bez zmian.

Lipidy obojętne

Największe zmiany po podaniu Bencyliny-1 uwidoczniły się w aktywności lipidów. U szczurów serii B oraz u myszy obu badanych serii obserwowano niejednokrotnie znaczne osłabienie zabarwienia lub ogniskowy brak sudanofilności (ryc. 5, 6). U pozostałych osobników (kontrolnych i doświadczalnych) obraz lokalizacji lipidów nie wykazywał zmian.

JELITO CZCZE

Barwienie hematoksyliną i eozyną

Podobnie jak w poprzednio opisywanym odcinku jelita cienkiego, również i w jelicie czczym nie stwierdzono w grupach doświadczalnych żadnych zmian tak w strukturze, jak i w barwności błon wchodzących w skład ściany jelita, w porównaniu z obrazem mikroskopowym grup kontrolnych.

Fosfataza zasadowa

Aktywność enzymu w jelicie czczym wykazywała różnice w poszczególnych grupach zwierząt (ryc. 7). U szczurów serii A po podawaniu leku p.o. oraz u myszy serii C następowało wzmoczenie reakcji w rąbku prążkowanym nabłonka (ryc. 8). W jelicie czczym szczurów serii B również po dożołądkowym podawaniu leku następował spadek odczynu, natomiast u myszy serii D nie zauważono żadnych zmian w porównaniu z obrazem kontrolnym.

Fosfataza kwaśna (FK)

Badany enzym w obrazie kontrolnym wykazywał największą aktywność w nabłonku jelitowym, znacznie mniejszą w gruczołach Lieberkühna. Niewielkie wzmoczenie odczynu wystąpiło w jelicie szczurów serii A po dootrzewnowym podaniu leku. Wyraźny spadek aktywności fosfatazy kwaśnej zaobserwowano u szczurów serii B — po dożołądkowym podaniu leku. U myszy doświadczalnych zarówno nasilenie odczynu, jak i lokalizacja enzymu nie różniła się od zwierząt kontrolnych.

Lipaza

W grupach zwierząt doświadczalnych serii A, B i C obserwowano umiarkowany spadek aktywności lipazy (ryc. 9, 10). Jedynie u myszy serii D nie zauważono różnic w porównaniu z kontrolą.

Intensywność reakcji oraz lokalizacja enzymu przypominały obrazy mikroskopowe opisane wyżej (dwunastnica).

Dehydrogenaza bursztynianowa (BDH)

W odróżnieniu od odczynu w dwunastnicy, w jelicie czczym zwierząt doświadczalnych serii A i B zauważono wzmoczenie aktywności enzymu, ujawniające się silniejszym zabarwieniem ziarenek wypełniających cyto-

plazmę enterocytów (ryc. 11, 12). U myszy obu serii nie wystąpiły zmiany w odczynie i lokalizacji BDH w porównaniu ze skrawkami kontrolnymi.

Lipidy obojętne

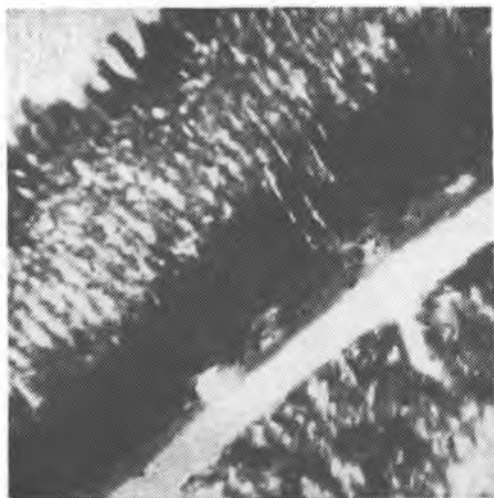
Obserwacje substancji sudanofilnych wykazały, że tylko w grupie szczurów poddanych toksyczności przewlekłej (seria B) po podaniu leku dożołądkowo nastąpiło osłabienie reakcji w nabłonku jelitowym. W zrębie kosmków oraz w gruczołach jelitowych odczyn nie uległ zmianie w porównaniu z obrazem kontrolnym.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

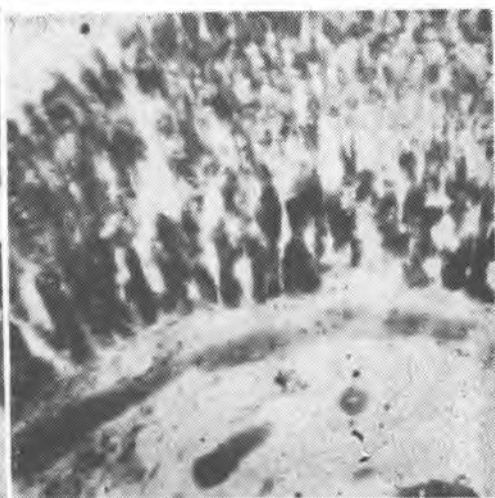
W obszernym piśmiennictwie dotyczącym zagadnienia penicylin półsyntetycznych (2—7, 9) rozważana jest m. in. sprawa odporności antybiotyków tej grupy na działanie enzymów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych w różnych narządach wewnętrznych. Nasze badania dotyczą zachowania się niektórych enzymów oraz lipidów obojętnych w trzech bardzo istotnych odcinkach przewodu pokarmowego po 6-tygodniowym i 3-miesięcznym podawaniu Bencyliny-1.

W żołądku zwierząt doświadczalnych otrzymujących lek przez 6 tygodni, tak drogą dootrzewnową, jak i dożołądkową, nie zaobserwowano uchwytnych zmian w aktywności badanych enzymów. Występowało natomiast u myszy doświadczalnych przekrwienie błony śluzowej i podśluzowej. Po 3 miesiącach podawania antybiotyku, poza nieznacznym obniżeniem aktywności fosfatazy zasadowej, w strukturach ściany żołądka szczura nie zauważono żadnych uchwytnych zmian. Podobnie jak po 6 tygodniach, występuje przekrwienie błony śluzowej i podśluzowej u myszy, ale również i u szczurów doświadczalnych tej serii.

W dwunastnicy po 6 tygodniach dootrzewnowego i dożołądkowego podawania Bencyliny-1 nie stwierdzono destrukcyjnych zmian u badanych zwierząt. Wahanie aktywności fosfatazy kwaśnej, obniżenie aktywności fosfatazy zasadowej i dehydrogenazy bursztynianowej oraz osłabienie sudanofilności struktur dwunastnicy myszy były w granicach stanu fizjologicznego i można je uważać za zjawisko czynnościowe. Po 3 miesiącach stosowania leku również nie obserwowano zmian w dwunastnicy szczura. Żywiej na lek reagowała dwunastnica myszy, gdzie występowało, zwłaszcza po codziennej dawce 60 mg/kg c.c., osłabienie aktywności fosfatazy zasadowej, fosfatazy kwaśnej, dehydrogenazy bursztynianowej i obniżenie sudanofilności enterocytów. Opisane zmiany mogą uchodzić za zjawisko czynnościowe.



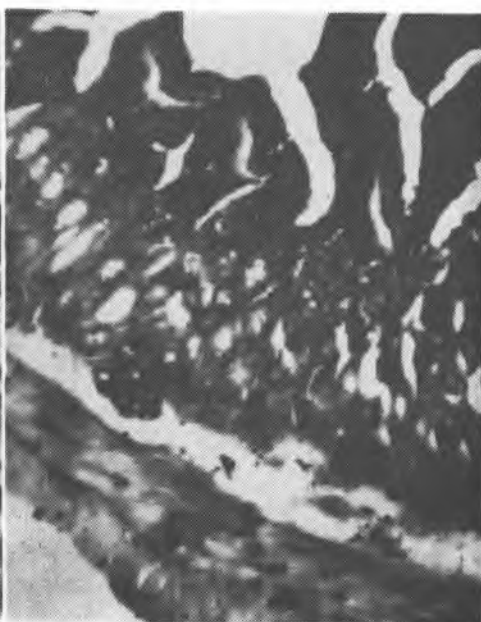
Ryc. 1



Ryc. 2



Ryc. 3



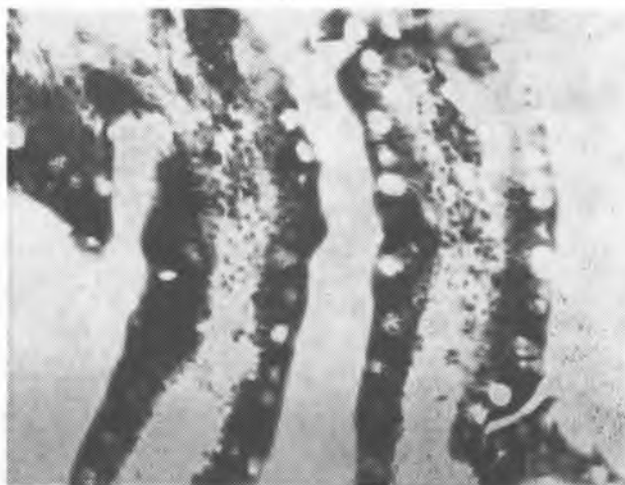
Ryc. 4



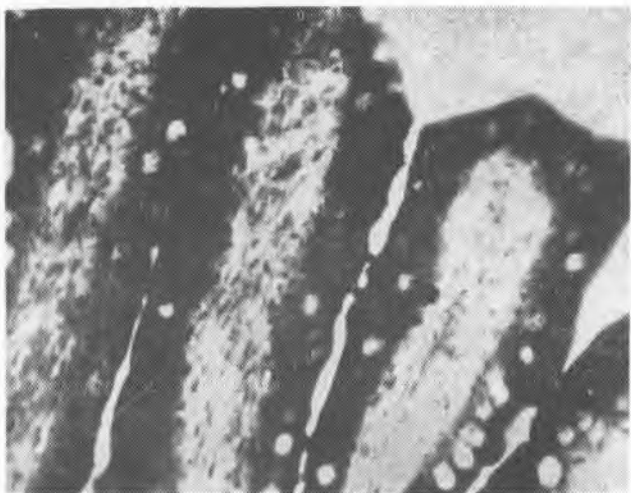
Ryc. 5



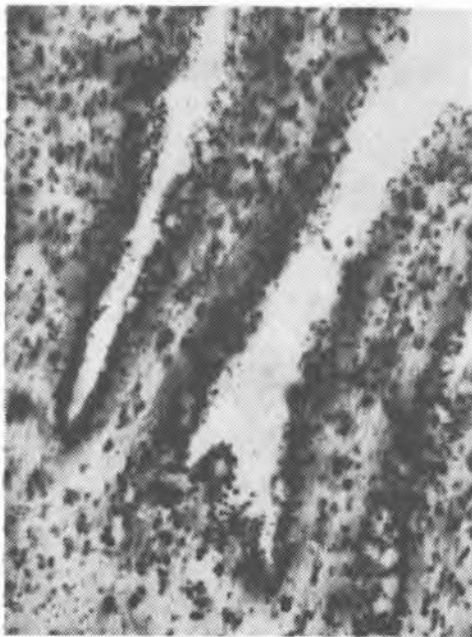
Ryc. 6



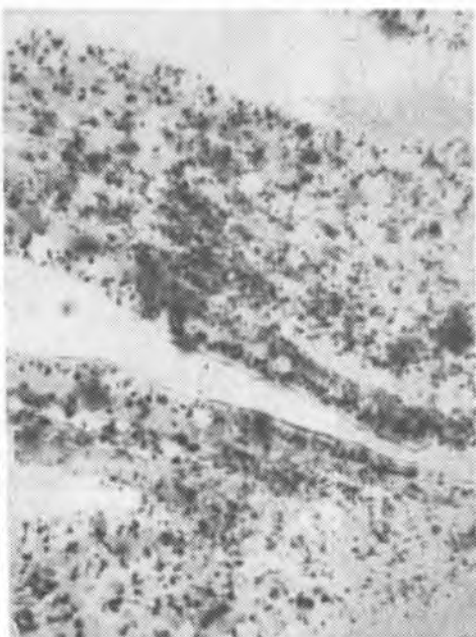
Ryc. 7



Ryc. 8



Ryc. 9



Ryc. 10



Ryc. 11



Ryc. 12

W ścianie jelita czczego zwierząt poddanych toksyczności podostrej (6 tygodni) obserwowano wahania aktywności badanych enzymów: FZ, FK, lipazy i BDH. Obserwowane różnice nie były jednak tak duże, aby można je było uważać za naruszenie stanu czynnościowego przewodu pokarmowego. Po 3 miesiącach doświadczenia obserwowane zmiany również nie świadczyły o uszkodzeniu błony śluzowej jelita czczego badanych zwierząt. Wahania aktywności enzymatycznej związane były z ogólnoustrojowym zaburzeniem stanu równowagi fizjologicznej, występującym po długotrwałym podawaniu antybiotyku.

Sądzić należy, że antybiotyk Bencylina-1 nie powinien wywierać ujemnego wpływu na układ histoenzymatyczny przewodu pokarmowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Borowicz P.: Bencylina — wstępna charakterystyka związku. Tarch. Z. Farm. Warszawa 1975.
2. Cieślak J., Buśko I.: Acta Polon. Pharm. 25, 501—505, 1968.
3. Flynn E. H.: *Cephalosporins and Penicillins*. Chemistry and Biology. Academic Press, New York—London 1972.
4. Hou J. P., Poole J. W.: J. Pharm. Sci. 60, 503—510, 1971.
5. Korzybski T., Kowszyk-Gindifer Z., Kuryłowicz W.: Antybiotyki. PZWL, Warszawa 1977.
6. Krotkiewska E.: Syntarpen. WKC, Warszawa 1974.
7. Michajlik A.: Tabelaryczny przegląd antybiotyków ze szczególnym uwzględnieniem leków „Polfa”. KAW, Kraków 1976.
8. Pat. PRL 58450 (Żukowski E., Eckstein Z., Pleniewicz J., 30 X 1969).
9. Tatoń J.: Terapia i Leki 3, 118—131, 1977.

Otrzymano 30 XI 1978.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Żołądek szczura kontrolnego. Seria B. Odczyn na fosfatazę zasadową wg metody Gomoriego. Pow. ca 120X.

Ryc. 2. Żołądek szczura grupy V doświadczalnej. Seria B. Odczyn na fosfatazę zasadową wg metody Gomoriego. Spadek aktywności enzymatycznej. Pow. ca 120X.

Ryc. 3. Dwunastnica szczura kontrolnego. Seria A. Odczyn na fosfatazę kwaśną wg metody Gomoriego. Pow. ca 120X.

Ryc. 4. Dwunastnica szczura grupy IV doświadczalnej. Seria A. Odczyn na fosfatazę kwaśną wg metody Gomoriego. Wzrost aktywności enzymatycznej. Pow. ca 120X.

Ryc. 5. Dwunastnica myszy kontrolnej. Seria C. Barwienie lipidów obojętnych metodą Lisona i Dagnelie'a. Pow. ca 120X.

Ryc. 6. Dwunastnica myszy grupy II doświadczalnej. Seria C. Barwienie lipidów obojętnych metodą Lisona i Dagnelie'a. Ogniskowe osłabienie zabarwienia. Pow. ca 120X.

Ryc. 7. Jelito czcze szczura kontrolnego. Seria A. Odczyn na fosfatazę zasadową wg metody Gomoriego. Pow. ca 400X.

Ryc. 8. Jelito czcze szczura grupy V doświadczalnej. Seria A. Odczyn na fosfatazę zasadową wg metody Gomoriego. Wzrost aktywności enzymatycznej w nabłonku. Pow. ca 400X.

Ryc. 9. Jelito czcze szczura kontrolnego. Seria B. Odczyn na lipazę wg metody Gomoriego i Takamatsu. Pow. ca 400X.

Ryc. 10. Jelito czcze grupy V doświadczalnej. Seria B. Odczyn na lipazę wg metody Gomoriego i Takamatsu. Spadek aktywności enzymatycznej. Pow. ca 400X.

Ryc. 11. Jelito czcze szczura kontrolnego. Seria A. Odczyn na dehydrogenazę bursztynianową wg metody Nachlasi i wsp. Pow. ca 400X.

Ryc. 12. Jelito czcze szczura grupy V doświadczalnej. Seria A. Odczyn na dehydrogenazę bursztynianową wg metody Nachlasi i wsp. Wzrost aktywności enzymatycznej w nabłonku. Pow. ca 400X.

РЕЗЮМЕ

Исследованиям подвергались: желудок, двенадцатиперстная кишка и тощая кишка крыс и мышей, которым вводились в течение 6 недель и 3 месяцев антибиотика названные Бенцилина-1, находящиеся в фазе лабораторной обработки в Фармацевтическом отделении „Польфа”. Срезы красились стандартным методом при помощи гематоксилина и еозина, выявляя активность щелочной и кислой энзиматической фосфатазы, липазы, сукциндегидразы, а также наличие нейтральных липидов.

В результате проведенных наблюдений установлено, что продолжительное введение Бенцилины-1 вызывает в желудке небольшое падение щелочной фосфатазы. В двенадцатиперстной кишке и тощей кишке, кроме колебаний в усилении активности исследуемых энзимов, что можно признать функциональным явлением, не замечено уловимых патологических изменений.

SUMMARY

Rats and mice were given an antibiotic called Bencylina-1 during a period of 6 weeks and 3 months. This antibiotic is in the phase of laboratory studies by TZF "Polfa". After the administration of Bencylina-1 the stomachs, duodema and jejuna of rats and mice were examined. Scraps were coloured with hematoxyline and eozyne according to the standard method and then the enzymatic activity of alkaline phosphatase, acid phosphatase lipase, succinate dehydrogenase was ascertained and the presence of neutral lipids was revealed.

On the basis of the observations it was found that a long lasting administration of Bencylina-1 causes a slight decrease in the alkaline phosphatase activity in the stomach. In the duodenum and jejunum no palpable pathologic changes were noticed apart from variation of activity of examined enzymes and neutral lipids (that can be considered a functional phenomenon).

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Stomach of a control rat. Series B. Reaction to alkaline phosphatase according to Gomori's method. Magn. ca 120X.

Fig. 2. Stomach of a rat from experimental group V. Series B. Reaction to alkaline phosphatase according to Gomori's method. Decrease of enzymatic activity. Magn. ca 120X.

Fig. 3. Duodenum of a control rat. Series A. Reaction to acid phosphatase according to Gomori's method. Magn. ca 120X.

Fig. 4. Duodenum of a rat from experimental group IV. Series A. Reaction to acid phosphatase according to Gomori's method. Increase of enzymatic activity. Magn. ca 120X.

Fig. 5. Duodenum of a control mouse. Series C. Colouring of lipids neutral according to Lison and Dagnelie. Focal weakening of staining. Magn. ca 120X.

Fig. 6. Duodenum of a mouse from experimental group II. Series C. Colouring of lipids neutral according to Lison and Dagnelie. Focal weakening of staining. Magn. ca 120X.

Fig. 7. Jejunum of a control rat. Series A. Reaction to alkaline phosphatase according to Gomori's method. Magn. ca 400X.

Fig. 8. Jejunum of a rat from experimental group V. Series A. Reaction to alkaline phosphatase according to Gomori's method. Increase of enzymatic activity in the intestined epithelium. Magn. ca 400X.

Fig. 9. Jejunum of a control rat. Series B. Reaction to lipase according to Gomori's and Takamatsu's method. Magn. ca 400X.

Fig. 10. Jejunum of a rat from experimental group V. Series B. Reaction to lipase according to Gomori's and Takamatsu's method. Decrease of enzymatic activity. Magn. ca 400X.

Fig. 11. Jejunum of a control rat. Series A. Reaction to succinate dehydrogenase according to the method by Nachlas and et.al. Magn. ca 400X.

Fig. 12. Jejunum of a rat from experimental group V. Series A. Reaction to succinate dehydrogenase according the method by Nachlas and et.al. Increase of enzymatic activity in the intestinal epithelium. Magn. ca 400X.

