

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXXIII, 9

SECTIO D

1978

Zakład Histologii i Embriologii. Instytut Biologiczno-Morfologiczny. Wydział Lekarski.
Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr med. dr h.c. Stanisław Grzycki

Irena KRÓLIKOWSKA-PRASAŁ

**Zmiany histochemiczne w komórkach nabłonka jelitowego szczura
w czasie hiperwitaminozy A**

Гистохимические изменения в клетках кишечной эпителиомы крысы во время
гипервитаминоза А

Histochemical Changes of Intestine Epithelium Cells of a Rat during
Hypervitaminosis A

Hiperwitaminoza A powoduje toksyczne zmiany u zwierząt i ludzi (2), prowadzi do degeneracji tłuszczowej wątroby i nerek, może powodować zwapnienia naczyń i serca (17) oraz zwyrodnienia nabłonków (10). Fell i wsp. (3) podają, że nadmiar witaminy A wpływa na różnicowanie się komórek nabłonka, może wytwarzać metaplastję oraz prowadzić do keratynizacji nabłonka (6, 12). Ra h a l k a r i wsp. (13) wskazują na zwiększoną aktywność fosfatazy zasadowej przy hiperwitaminozie A w wątrobie, nerce i jelicie cienkim, a H s u i T a p p e l (7), stosując metody biochemiczne, stwierdzili zmniejszenie poziomu β -glukuronidazy.

Transport witaminy A przez ścianę jelita związany jest z dostarczaniem energii, jest on głównie przyspieszany przez nadmiar glikozy i ATP (18). Duże znaczenie w transporcie i metabolizmie witaminy A posiadają lipoproteidy (5), jednakże funkcja witaminy A w zachowaniu strukturalnej integracji lipoproteidów komórek nabłonka i innych tkanek nie została całkowicie wyjaśniona. Zagadnienie wpływu witaminy A na komórki nabłonka jelitowego jest nadal aktualne ze względu na jego funkcję w procesach absorpcyjnych i w związku z tym wydaje się nam celowe prześledzenie zmian w odczynach histochemicznych podczas hiperwitaminozy A.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Doświadczenie przeprowadzono na 24 szczurach białych, obu płci, które otrzymywały dietę standardową. Podzielono je na 3 grupy doświadczalne i 1 grupę kontrolną. Szczurom doświadczalnym podawano podskórnie witaminę A (*Vitaminum A* produkcji „Polfa” — Poznań, nr serii 10177). Zwierzęta grupy I doświadczalnej otrzymywały 1 raz dziennie 10 000 j.m. (33 333 j.m./kg ciężaru ciała) witaminy A przez okres 7 dni. Szczury grupy II otrzymywały 2 razy dziennie po 10 000 j.m. (66 666 j.m./kg ciężaru ciała) przez 7 dni. Szczury grupy III otrzymywały witaminę A w tych samych dawkach i w ten sam sposób jak w grupie II, a następnie pozostawiono je na okres 3 tygodni nie podając preparatu. Szczury kontrolne otrzymywały sól fizjologiczną w ilości 2 ml przez 7 dni. Podawanie witaminy A odbywało się zawsze o tej samej porze dnia.

Po 24 godz. od ostatniej iniekcji zwierzęta grup I, II i kontrolnej, a po 3 tygodniach grupy III dekapitowano i pobierano wycinki jelita cienkiego. Wykonywano następujące odczyny histochemiczne: 1) oznaczano kwasy nukleinowe wg Bracheta, 2) mukopolisacharydy stosując reakcję wg McManusa, 3) lipidy barwiono sudanem, 4) fosfatazę kwaśną wg Gomoriego, 5) fosfatazę zasadową wg Gomoriego, 6) dehydrogenazę bursztynianową wg Nachlas i wsp., 7) dehydrogenazę mleczanową wg Pearse'a i 8) dehydrogenazę glikozo-6-fosforanową wg Pearse'a.

Wycinki jelita przeznaczone do oznaczeń na kwasy nukleinowe i polisacharydy utrwalano w płynie Carnoya, zatapiano w parafinie. Do oznaczeń tłuszczów oraz fosfatazy kwaśnej i zasadowej wycinki utrwalano w płynie Bakera i następnie cięto skrawki na mikrotomie mrozeniowym. Enzymy oddechowe, tj. dehydrogenazy: bursztynianową, mleczanową i glikozo-6-fosforanową oznaczano histochemicznie na skrawkach nie utrwalonych, ciętych w kriostacie Pearse'a. Inkubację dla fosfatazy kwaśnej i zasadowej przeprowadzano przez 1 godz. w środowisku podanym przez Gomoriego w temp. 37°C, natomiast dla dehydrogenaz — przez 30 min. w płynach inkubacyjnych podanych przez Nachlas i wsp. oraz Pearse'a w temp. 37°C. W tych ostatnich jako donatora elektronów stosowano nitro BT. Dla reakcji enzymatycznych wykonywano próby kontrolne, przeprowadzając inkubację w środowisku bezsubstratowym w tych samych warunkach.

WYNIKI BADAŃ

Grupa I doświadczalna

U zwierząt grupy I stwierdzono zmiany w wyglądzie zewnętrznym. Zmiany te wyrażały się żółknięciem, nastroszeniem i plackowatym wypadaniem sierści. Śluzówki oczu wskazywały na stan zapalny. Zauważono brak łaknienia, a zwierzęta stawały się ospałe.

Przeprowadzone odczyny histochemiczne wskazują na zmiany w komórkach nabłonka jelitowego i gruczołów. Reakcja na RNA w cytoplazmie jest słabsza w porównaniu z obserwowaną na preparatach kontrolnych. Mukopolisacharydy dające reakcję PAS dodatnie wykazują słabsze odczyny w mukocytach. Substancje tłuszczowe barwiące się sudanem czar-

nym dają wzrost odczynów w cytoplazmie enterocytów. Intensywną sudanofilność wykazano również w zrębie łącznotkankowym kosmków jelitowych (ryc. 1).

Produkt reakcji enzymatycznej na aktywność fosfatazy kwaśnej wskazuje na obecność znacznej ilości lizosomów w enterocytach nabłonka jelitowego. Mukocyty pozostają jasne, nie dają odczynu na fosfatazę kwaśną. Osłabienie odczynu na aktywność fosfatazy zasadowej wystąpiło w rąbku oskórkowym komórek walcowatych nabłonka jelitowego.

Odczyn na dehydrogenazę bursztynianową był bardziej intensywny niż w grupie kontrolnej. Niebieskie ziarna dwuformazanu wypełniały cytoplazmę enterocytów. Nie wykazano istotnych zmian w odczynach na dehydrogenazę mleczanową, odczyny były podobne do tych, które obserwowano w kontroli. Zauważono natomiast nieznaczne osłabienie reakcji na dehydrogenazę glikozo-6-fosforanową.

Grupa II doświadczalna

Opisane poprzednio zmiany w wyglądzie zewnętrznym zwierząt jeszcze bardziej pogłębiały się. Zwierzęta były ospałe z nastroszoną sierścią i dużymi plackowatymi łysieniami, zwłaszcza na brzusznej stronie. Niektóre z nich kulały. Przyjmowały znacznie mniejsze ilości pokarmu.

Przeprowadzone reakcje histochemiczne wskazują na większe różnice w odczynach histochemicznych w porównaniu z kontrolą. Następuje osłabienie pironinochłonności cytoplazmy enterocytów wskazujące na zmniejszenie RNA w komórce (ryc. 2). Reakcje PAS dodatnie w nabłonku nie różnią się od uzyskanych w grupie I, są jednak słabsze niż w kontroli (ryc. 3). Sudanofilność komórek nie ulega zmianie, zauważono jej wzrost w tkance łącznej, stanowiącej zrąb kosmków jelitowych. Wykazano również znaczne ilości lizosomów w enterocytach, świadczące o degeneracji tych komórek. Odczyny na enzymy oddechowe, tj. dehydrogenazy bursztynianową i glikozo-6-fosforanową, podobne są do grupy I, natomiast zauważono obniżenie intensywności reakcji na dehydrogenazę mleczanową (ryc. 4).

Grupa III doświadczalna

Zwierzęta tej grupy po 2-krotnym dziennym podaniu witaminy A przez okres 7 dni (jak w grupie II) pozostawiono na okres 3 tygodni i dopiero wówczas pobierano materiał do badań. Wygląd zewnętrzny zwierząt poprawił się, przyjmowały więcej pokarmu, pozostały jednak ospałość, zapalenie spojówek i plackowate wyłysienia.

Zmiany w reakcjach histochemicznych w porównaniu z grupą II były niewielkie. Zauważono jednak, że pironinochłonność cytoplazmy enterocytów wzrosła, ale nie dorównywała tej, jaką obserwowano w kontroli. Reakcja PAS dodatnia występowała przede wszystkim w mukocytach, enterocyty wykazywały bardzo słabe odczyny. Również sudanofilność komórek nabłonka nie różniła się od występującej w grupie II. Stwierdzono znaczne nagromadzenie lizosomów w komórkach nabłonka jelitowego (ryc. 5), natomiast aktywność fosfatazy zasadowej nie uległa zmianie. Zmniejszała się także aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (ryc. 6) i mleczanowej, natomiast nie zauważono zmian w odczynach na dehydrogenazę glikozo-6-fosforanową.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

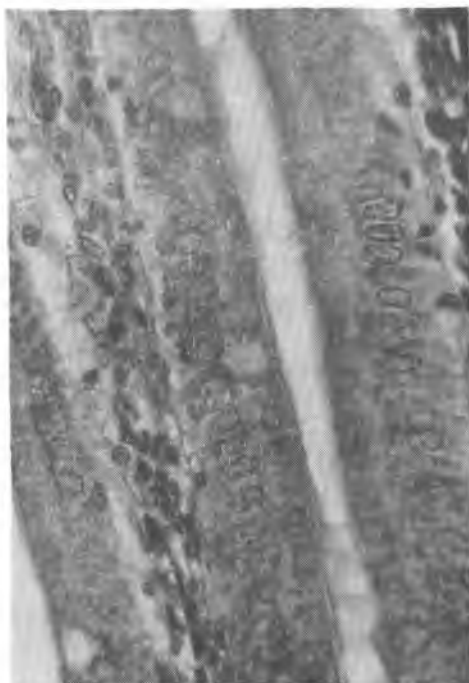
Z badań Fell i Thomasa (4) wynika, że witamina A może wpływać na aktywność hydrolityczną enzymów komórkowych. Potwierdzają to nasze badania, wskazujące na wzrost aktywności fosfatazy kwasnej i spadek fosfatazy zasadowej w komórkach nabłonka jelitowego zwierząt wszystkich grup doświadczalnych. Obniżenie aktywności fosfatazy zasadowej związane jest ze zmianą przepuszczalności błon komórkowych. Potwierdzają to Brown i wsp. (1) uważając, że toksyczne dawki witaminy A powodują zmiany przepuszczalności błon wskutek spadku sulfonacji mukopolisacharydów związanych z lipoproteinami komórkowymi.

Odczyny na RNA wskazują na obniżenie pironinochłonności w cytoplazmie komórek nabłonka jelitowego. Natomiast w tych samych komórkach obserwowano wzrost sudanofilności. Należy zatem sądzić, że hiperwitaminoza A powoduje obniżenie RNA i wzrost substancji tłuszczowych w nabłonku jelitowym.

Podczas hiperwitaminozy A występują zmiany aktywności enzymów oddechowych związanych z błonami mitochondrialnymi. Wskazuje na to wzrost aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w grupach I i II oraz obniżenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej i glikozo-6-fosforanowej w grupie II nabłonka jelitowego. Podobne zmiany obserwowano w aktywności dehydrogenaz komórek wątrobowych przy hiperwitaminozie A (8). Badania Modisa i wsp. (11) wskazują na uszkodzenie błon mitochondrialnych. Witamina A działa bezpośrednio na cytomembrany, a enzymy związane z tymi błonami określają nie tylko strukturę molekularną, lecz także stan fizykochemiczny i stopień reaktywności. Natomiast Lucy i wsp. (9) stwierdzają, że nadmiar witaminy A powoduje pęcznienie mitochondriów, a Ray i Sadhu (15) uważają, że hiperwitaminoza A hamuje oddychanie komórek wątrobowych przez wpływ na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. Również Seward i wsp.



Ryc. 1



Ryc. 2



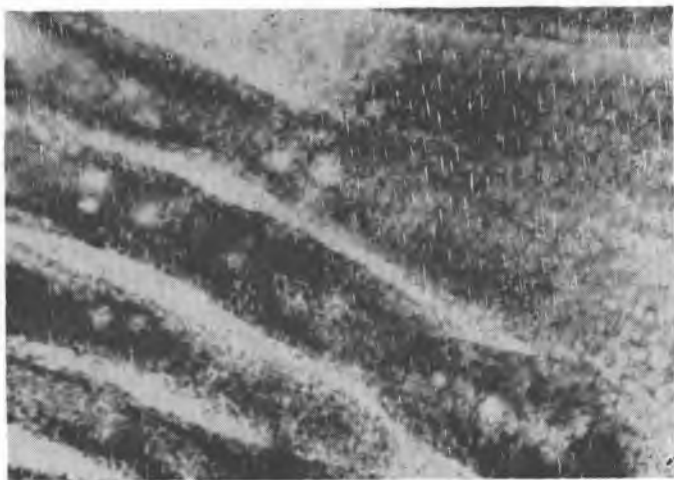
Ryc. 3



Ryc. 4



Ryc. 5



Ryc. 6

(16) podają, że wysokie dawki witaminy A wpływają na zmiany w oddychaniu komórkowym oraz na spadek białek komórkowych (14).

Reakcje PAS dodatnie na mukopolisacharydy wskazują na obniżenie ich zawartości w mukocytach nabłonka jelitowego. Nie obserwowano zmian odczynów PAS dodatnich w enterocytach. Modis i wsp. (11) stwierdzili zwyrodnienie śluzowe oraz hipersekreję mucyn podczas hiperwitaminozy A, a wolniejsze wydzielanie przy hipowitaminozie. Autorzy sugerują, że witamina A jest czynnikiem wpływającym na wzrost syntezy mukopolisacharydów i mucyn oraz powoduje wzrost wydzielania, któremu towarzyszy metaplasja nabłonków.

Na podstawie otrzymanych wyników można sądzić, że duże dawki witaminy A powodują:

1. Obniżenie RNA i wzrost substancji tłuszczowych w nabłonku jelitowym.

2. Wzrost aktywności fosfatazy kwasnej przy jednoczesnym obniżeniu aktywności fosfatazy zasadowej.

3. Zmiany w aktywności enzymów oddechowych: wzrost aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i obniżenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej i glikozo-6-fosforanowej.

4. Zmniejszenie mukopolisacharydów w mukocytach związane jest z hipersekrecją mucyn podczas hiperwitaminozy A.

PIŚMIENNICTWO

1. Brown J. cyt. wg Seward i wsp.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **117**, 477—482, 1964.
2. Ehrengut W.: *Dtsch. Med. Wochenschrift* **47**, 1837—1838, 1972.
3. Fell H. B., Mallanby E.: *J. Physiol.* **119**, 470—473, 1953.
4. Fell H. B., Thomas J.: *J. Exptl. Med.* **111**, 719—744, 1960.
5. Ganguly J.: *Vitamin and Hormones* **18**, 387—402, 1960.
6. Góra B.: *Czas Stom.* **26**, 1155—1162, 1973.
7. Hsu L., Tappel A. L.: *Biochim. biophys. Acta* **101**, 113—120, 1965.
8. Królikowska-Prasał I., Jabłońska W.: *Folia Morph. (Warszawa)* **34**, 359—366, 1977.
9. Lucy J. A., Luscombe M., Dingle J. T.: *Biochem. J.* **89**, 419—421, 1963.
10. McLean F. C., Budy A. M.: *Vitamins and Hormones* **21**, 51—68, 1963.
11. Modis L., Spreca A., Süveges-Modis J.: *Acta anat.* **83**, 481—504, 1972.
12. Polliack A., Ben-Sasson Z.: *Nature* **243**, 547—548, 1971.
13. Rahalkar A. D., Nerurkar M. K., Sahasrabudke M. B.: *Indian. J. Med. Sci.* **10**, 716—719, 1956.
14. Ram G., Misra U. K.: *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **45**, 3—19, 1975.
15. Ray A., Sadhu D. P.: *Am. J. Physiol.* **196**, 1274—1276, 1959.
16. Seward C. R., Vaughan G., Hove E. L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **117**, 477—482, 1964.

17. Strebel R. F., Girerd R. J., Wagner B. M.: Arch. Path. 87, 290—297, 1969.
18. Wilson T. H., Wiseman G.: J. Physiol. 123, 116—120, 1954.

Otrzymano 30 XI 1976.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Sudanofilność w kosmkach jelitowych szczura grupy I doświadczalnej. Barwienie sudanem czarnym. Pow. ok. 150×.

Ryc. 2. Reakcja na RNA w komórkach nabłonka jelitowego szczura grupy II doświadczalnej. Metoda wg Bracheta. Pow. ok. 250×.

Ryc. 3. Reakcja PAS dodatnia w mukocytach nabłonka jelitowego szczura grupy II doświadczalnej. Metoda PAS wg McManusa. Pow. ok. 300×.

Ryc. 4. Reakcja na aktywność dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej w nabłonku i gruczołach jelitowych grupy II doświadczalnej. Metoda wg Pearse'a. Pow. ok. 250×.

Ryc. 5. Reakcja na aktywność fosfatazy kwaśnej w komórkach nabłonka jelitowego szczura grupy III doświadczalnej. Metoda wg Gomoriego. Pow. ok. 400×.

Ryc. 6. Reakcja na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w nabłonku jelitowym szczura grupy III doświadczalnej. Metoda Nachlas i wsp. Pow. ok. 250×.

РЕЗЮМЕ

Исследовано влияние гипervитаминоза А на гистохимические реакции нуклеиновой кислоты, мукополисахаридов, липоидов и некоторых энзимов таких как: кислой фосфатазы, основной фосфатазы и янтарной, лактатной и глюкозо-6-фосфатной дегидрогеназы в тонкой кишке белой крысы во время гипervитаминоза А. Результаты исследований показывают, что гипervитаминоз А вызывает понижение количества RNA и рост жирных веществ в кишечной эпителиоме. Показано, что росту активности кислой фосфатазы сопутствует одновременное понижение активности основной фосфатазы. Обнаружено изменения в активности дыхательных энзимов, а также понижение положительной реакции PAS в мукоцитах при гипervитаминозе А.

SUMMARY

The influence of hipervitaminosis A on the histochemical reactions of nucleic acid, mucopolysaccharides, lipids and some enzymes such as: acid phosphatase, alkaline phosphatase and succinic, lactic and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the small intestine of white rats has been studied.

It was found that at hipervitaminosis A a decrease in RNA and an increase in the lipid substances in the small intestine epithelium occurred. An increase in the acid phosphatase and a decrease in the alkaline phosphatase activities has been demonstrated. At hipervitaminosis A changes in the oxydative enzymes activity and a decrease in the PAS positive reaction in mucous cells of the small intestine has been observed.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Sudanophilic substance of villus of the jejunum of a rat in the I experimental group. Sudan black reaction. Magn. ca 150X.

Fig. 2. Reaction to RNA of intestinal epithelium cells of II experimental group. Method of Brachet. Magn. ca 250X.

Fig. 3. PAS positive reaction of intestine epithelium of mucous cells in II experimental group. PAS method by McManus. Magn. ca 300X.

Fig. 4. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of epithelial and glandular cells of jejunum in II experimental group. Method of Pearse. Magn. ca 250X.

Fig. 5. Acid phosphatase activity of intestine epithelium cells of rat III experimental group. Method of Gomori. Magn. ca 400X.

Fig. 6. Succinic dehydrogenase activity in intestine epithelium of rat of III experimental group. Method of Nachlas et al. Magn. ca 250X.

