

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii z Pracownią Cytofizjologii Doświadczalnej.

Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. Józef Staszyc

Grażyna ORLICZ

**Ocena komórek śluzowych przewodu pokarmowego u szczura
poddanego doświadczalnemu stresowi**

**Оценка клеток слизистой оболочки пищеварительного тракта у крыс
во время экспериментального стресса**

**Estimation of Mucocytes of the Digestive Tract in Rat
Exposed to the Experimental Stress**

Zwierzęta doświadczalne poddawano działaniu silnego stresu w czasie 1—4 godz. Obserwowano nasilające się w miarę trwania stresu zmiany w śluzówce żołądka i dwunastnicy. W żołądku dochodziło do powstania ostrych wrzodów. W obu narządach istotne zmiany widoczne były w ilości i morfologii komórek śluzowych i śluzu.

Spośród wielu teorii patogenezy choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy bezspornie uznawany jest obecnie pogląd o zachwianiu równowagi między zdolnością trawienną soku żołądkowego a działaniem czynników ochronnych. W r. 1951 Hollander wprowadził pojęcie bariery śluzowej, która stanowić ma główny element ochrony śluzówki żołądka przed uszkodzeniem. Pod względem morfologicznym barierę śluzową można zróżnicować na dwie części — komórki błony śluzowej oraz wytworzoną przez nie warstwę śluzu. W ostatnich latach zaproponowano dynamiczny model bariery żołądkowej, ujmując ją jako ciągle zmieniającą się zdolność żołądka do zapobiegania urazom śluzówki, a uzależnioną od jej ukrwienia, równowagi kwasowo-zasadowej oraz aktualnego stanu pobudzenia ustroju (11, 14).

W pracy niniejszej postanowiono zbadać wpływ silnego stresu na stan morfologiczny śluzówki żołądka ze szczególnym uwzględnieniem bariery śluzowej.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania wykonano na szczurach samcach rasy Wistar. Zwierzęta poddawano stresowi immobilizacji w niskiej temperaturze. Na 24 godz. przed stresem pozbawiano zwierzęta pokarmu, a następnie zawijano je w druciane elastyczne siatki, aby nie mogły wykonywać ruchów, przy zachowanej możliwości swobodnego oddychania. Tak unieruchomione zwierzęta umieszczano w temp. $+4^{\circ}\text{C}$ na czas 1—4 godz. w odpowiednich grupach (S_1 — 1 godz., S_2 — 2 godz., S_3 — 3 godz., S_4 — 4 godz.). Następnie szczury dekapitowano i pobierano do badań żołądki i dwunastnice. Tkanki utrwalano w 4% formalinie obojętnej, odwadniano i zatapiano w parafinie. Skrawki krajano na grubość 8 μm . Wykonano barwienie hematoksyliną i eozyną oraz PAS według McManusa. Każda z badanych grup liczyła po 10 zwierząt. Grupę kontrolną stanowiły szczury głodzone przez 24 godz.

WYNIKI BADAŃ

U zwierząt poddanych stresowi obserwowano duże zmiany w części gruczołowej żołądka. Tak zwany przedżołądek szczurów (część niegruczołowa, płaskonabłonkowa) zmian nie wykazywał.

Po 1 godz. stresu (grupa S_1) obserwowano makroskopowo niewielkie wybroczyny oraz przekrwienie śluzówki żołądka, z wyjątkiem szczytów fałdów, na których śluzówka była zanemizowana. Typowe zmiany wrzodowe zauważono w tej grupie tylko u 3 zwierząt. Były to małe destrukcje na fałdach śluzówki, o wyglądzie czarnych punktów i niewielkiej powierzchni. Mikroskopowo widoczne były powierzchowne ubytki nabłonka błony śluzowej, stan zapalny śluzówki oraz duże przepojenie krwotoczne barwnikiem krwi z dodatnim odczynem na hemosyderynę. Naczynia krwionośne powierzchowne i głębokie poszerzone, dające obraz przekrwienia biernego z erytroragiami. W reakcji PAS obserwowano wyraźne zmniejszenie ilości komórek kubkowych.

Stres trwający 2 godz. wyraźnie zwiększył zmiany w żołądku. Stwierdzono po kilka drobnych wrzodów, umiejscowionych głównie na fałdach śluzówki, oraz towarzyszące im wybroczyny. Widoczne było przepojenie krwotoczne z ogniskowym złuszczeniem komórek nabłonka śluzówki oraz powierzchowną martwicą włóknikowatą, sięgającą poza błonę podstawną nabłonka w głąb tkanki. Wokół wrzodów następowało całkowite zniknięcie mukocytów, w pozostałych częściach śluzówki — zmniejszenie ich ilości. W pobliżu wrzodów obserwowano marginację śluzu z odczynu dyfuzyjnego ze ścisłym przyleganiem do bezpośredniego otoczenia i brzegu zmiany destrukcyjnej (grupa S_2).

W grupie S_3 (po 3 godz. stresu) nastąpiło dalsze zwiększenie powierzchni i liczby wrzodów, między którymi również widoczne były niewielkie wybroczyny krwawe. Bardzo rozległa martwica włóknikowata

obejmowała ogniskowo połowę, a nawet 2/3 grubości błony śluzowej, miejscowo oddzielając się od reszty tkanki. Śluzówka z silnym odczynem zapalnym, z utrzymującą się marginacją śluzu oraz brakiem komórek śluzowych przy wrzodzie i z dużą redukcją ich ilości w pozostałych częściach śluzówki żołądka.

Największe zmiany obserwowano po 4 godz. stresu (grupa S_4). Powierzchnia żołądka usiana była licznymi małymi i większymi destrukcjami, cała śluzówka z wybroczynami, przekrwiona. Obserwowano nasilenie zmian destrukcyjnych w porównaniu z grupą S_3 — głębokie i rozległe wrzody z martwicą włóknikowatą, miejscowo obecne również ubytki powierzchniowe śluzówki z intensywnym odczynem zapalnym i ogniskowym oddzielaniem się mas martwiczych. W preparatach barwionych metodą PAS obserwowano resztki rozpadających się komórek śluzowych.

W dwunastnicy u badanych zwierząt makroskopowo obserwowano jedynie przekrwienie narządu, najbardziej intensywne po stresie 4-godzinny. W preparatach histologicznych już po 1 godz. stresu widoczne były zmiany w kosmkach w postaci obrzęku. W miarę przedłużania stresu pojawiały się pojedyncze wybroczyny krwawe oraz nacieki zapalne. Po 4 godz. stresu obrzęk kosmków był znacznie nasilony w porównaniu z pozostałymi grupami. W środku kosmków obecny był wysięk włóknikowy. W całej tkance stwierdzano wyraźne nasilenie nacieków zapalnych z dużym przekrwieniem narządu.

Wyraźne były również zmiany w dwunastnicy pod wpływem stresu oceniane po wykonaniu barwienia PAS. W grupie S_1 wystąpiło wyraźne zwiększenie ilości komórek śluzowych w porównaniu z kontrolą, głównie na szczytach kosmków. Po 2 godz. stresu obserwowano dużą ilość śluzu na powierzchni kosmków, z podobną ilością komórek śluzowych jak w grupie S_1 . Widoczne było również zaczynające się przegrupowanie mukocytów — znikwały one ze szczytów kosmków i zaczynały się grupować przypodstawnie. W grupie S_3 następowało dalsze grupowanie się komórek w gruczołach, a zmniejszenie ich ilości na szczytach kosmków. Nadal utrzymywało się wydzielanie dużej ilości śluzu wraz z mukocytami do światła jelita. Po 4 godz. stresu obraz dwunastnicy w reakcji PAS podobny był jak w grupie S_3 — mukocyty zgrupowane głębiej w tkance, a pojedyncze kosmki prawie całkowicie wypełnione komórkami śluzowymi.

U zwierząt poddanych ostremu stresowi immobilizacji w warunkach oziębienia zaobserwowano wyraźne nasilenie się zmian destrukcyjnych śluzówki w miarę przedłużania stresu oraz duże zmiany tkanki w reakcji PAS.

DYSKUSJA

Śluz żołądkowy spełnia szereg istotnych funkcji w celu ochrony ściany żołądka przed czynnikami szkodliwymi. Jest inhibitorem enzymów proteolitycznych i peptydaz trzustkowych, zapobiega zwrotnemu wchłanianiu jonów wodorowych do śluzówki, dostarcza wodorowęglanów neutralizujących kwas żołądkowy (3, 5). Własności fizykochemiczne śluzu wpływają na łatwiejszy pasaż trawionych substancji, a dzięki zawartości IgA śluz stanowi również barierę przeciwbakteryjną (12). Istotą przeciwwrzodowych właściwości bariery śluzowej jest przeciwpłukowa neutralizacja kwasu żołądkowego (1). Śluz żołądkowy jest wytwarzany w sposób nieprzerwany. Pomimo stałej produkcji śluzu żołądkowego szereg czynników bierze udział w regulacji jego wydzielania. Główną rolę odgrywają w tym autonomiczny układ nerwowy oraz hormony — zarówno narządów dokrewnych, jak i komórek APUD układu żołądkowo-jelitowo-trzustkowego. Regulacji nerwowej i hormonalnej podlega zarówno ilość, jak i jakość wydzielanego śluzu (15, 16).

W przeprowadzonym doświadczeniu obserwowano istotne zmiany w śluzówce żołądka i dwunastnicy pod wpływem silnego stresu. Komórki śluzowe w żołądku ulegały rozpadowi, a w miarę trwania stresu zmniejszała się znacznie ilość żołądkowego śluzu. W dwunastnicy następowało stopniowe przegrupowanie mukocytów ze znikaniem ich ze szczytów kosmków, gdzie zaczynał się proces intensywnego złuszczenia nabłonka. Unieruchomienie w czasie 4 godz. w niskiej temperaturze stanowiło dla badanych zwierząt silny stres, który powodował powstanie ostrych wrzodów żołądka. W istotny sposób nasilenie zmian wrzodowych korelowało z postępującym zanikiem warstwy ochronnej śluzu oraz rozpadem komórek śluzowych. W dwunastnicy zmiany te postępowały wolniej w porównaniu z żołądkiem i nawet po 4 godz. stresu w tkance widoczna była duża ilość mukocytów i śluzu. W narządzie tym nie obserwowano makroskopowo wrzodów, a histologicznie widoczne było złuszczenie komórek nabłonka z miejscowymi niewielkimi ubytkami śluzówki w grupie najdłuższej poddanej stresowi.

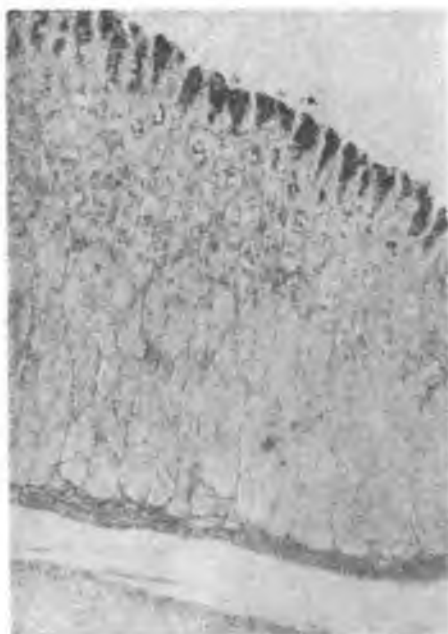
H o l l a n d e r (2) obserwował u psów zmniejszenie wydzielania śluzu pod wpływem drażnienia nerwu X. Badacz ten wykazał również, że pobudzenie układu adrenergicznego powoduje wydzielanie małej ilości gęstego, lepkiego, alkalicznego śluzu żołądkowego. Leki pobudzające układ współczulny okazały się bardzo silnymi stymulatorami wydzielania śluzu żołądkowego (13). Rozbieżne są wyniki dotyczące wpływu hormonów kory nadnerczy na barierę śluzową. M e n g u y i M a s t e r s (7) wykazali zmniejszenie wydzielania i zawartości śluzu w żołądku po kortyzonie. K o z ł o w s k a (4) opisuje natomiast efekt zwiększania zawartości gliko-



Ryc. 1



Ryc. 2



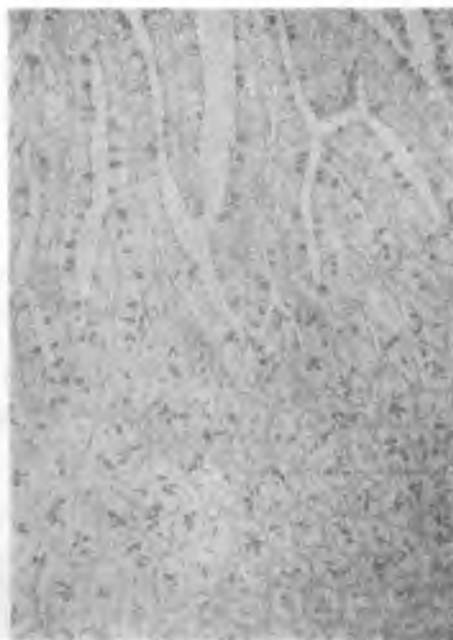
Ryc. 3



Ryc. 4



Ryc. 5



Ryc. 6



Ryc. 7

proteidów w żołądku pod wpływem ACTH. Wiele uwagi poświęcono wpływowi enterohormonów na wydzielanie śluzu. Szczególnie ciekawe i dość jednoznaczne wyniki uzyskiwano w badaniach nad wpływem serotoniny. Stwierdzono wyraźny pobudzający jej wpływ na wydzielanie śluzu żołądkowego, bez zmiany jego składu biochemicznego (6, 8). Metodami immunocytochemicznymi stwierdzono w żołądku i dwunastnicy dużą ilość enterochromafinocytów produkujących serotoninę. Wysłunięto w związku z tym hipotezę o ochronnej, parakrynnnej funkcji tej aminy w śluzówce przewodu pokarmowego.

Przemawiają za tym również własne badania nad wpływem stresu na ilość serotoniny oraz na enterochromafinocyty w żołądku i dwunastnicy u szczurów. Badania te wykazały znaczne zmniejszenie ilości komórek EC w tkankach, proporcjonalne do czasu trwania stresu i powierzchni wrzodów żołądka. Obserwowano również, że katabolizm serotoniny był bardziej intensywny w żołądku niż w dwunastnicy (10). Przyjmując za słuszną hipotezę o stymulacyjnym działaniu serotoniny na wydzielanie śluzu, można by na tej podstawie wytłumaczyć większą odporność dwunastnicy na stres.

Trwają ciągle badania nad nie wyjaśnioną w pełni patogenezą choroby wrzodowej. Poszukuje się wciąż nowych leków, powodujących szybkie gojenie niszy wrzodowej, zmniejszenie nawrotowości wrzodów oraz ich profilaktykę u osób podatnych na tę chorobę. Wielu autorów widzi w tym dużą szansę poprzez ingerencję w barierę śluzową i stymulację wydzielania śluzu. Taki mechanizm działania mają między innymi prostaglandyny (9). Zjawiskom cytoprotekcji i prawidłowemu funkcjonowaniu bariery śluzowej przypisuje się obecnie główne znaczenie w ochronie przed czynnikami agresji. Znajomość czynników uszkadzających tę barierę pozwoli zatem bardziej świadomie ingerować w jej metabolizm.

PIŚMIENNICTWO

1. Allen A., Garner A.: Gastric Mucus and Bicarbonate Secretion and Their Possible Role in Mucosal Protection. *Gut* 21, 244, 1980.
2. Hollander F.: The Physiology and the Chemistry of the Secretion of Gastric Mucus. *Gastroenterology* 43, 304, 1962.
3. Konturek S.: Fiziologia układu trawiennego. [w:] Fiziologiczne podstawy gastroenterologii. PZWL, Warszawa 1976. 119—138.
4. Kozłowska K.: Badania nad wpływem ACTH i kortyzonu na kompleksy węglowodanowo-białkowe błony śluzowej żołądka szczura białego. *Ann. Acad. Med. Gedan.* 2, 9, 1972.
5. Martin F. i wsp.: A Study of the Mechanisms of Inhibition of Peptic Proteolysis by a Sulphated Polysaccharide. *Digestion* 1, 165, 1968.
6. Menguy R.: Regulation of Gastric Mucus Secretion. [w:] Shnitka T. K.,

- Gilbert J. A. L., Harrison R. C.: Gastric Secretion Mechanisms and Control. University of Alberta 1967. 177—212.
7. Menguy R., Masters Y. F.: Effect of Cortisone on Mucoprotein Secretion by Gastric Antrum of Dogs: Pathogenesis of Steroid Ulcer. *Surgery* 54, 19, 1963.
 8. Menguy R., Thompson A. E.: Regulation of Secretion of Mucus from the Gastric Antrum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 140, 797, 1967.
 9. Oclanken P., Mowat C., Himel H. S.: The Role of Mucus Glycoprotein in Prostaglandin Cytoprotection. *Amer. J. Gastroenterology* 73, 496, 1970.
 10. Orlicz G., Zabel M., Jaroszewski J.: Influence of Experimentally Induced Stressed Gastric Ulcers on Enterochromaffin Cells and on a Level of Serotonin and 5-hydroxyindoloacetic Acid in a Stomach and a Duodenum of a White Rat. *Z. mikr.-anat. Forsch.* 1989 (w druku).
 11. Silen W.: New Concept of the Gastric Mucosal Barrier. *Am. J. Surg.* 133, 8, 1977.
 12. Spohn M., McColl I.: Studies on Human Gastric Mucosal Immunoglobulin. *Am. Biochem. Biophys. Acta* 576, 1, 1979.
 13. Vagne M., Perret G.: Regulation of Gastric Mucus Secretion. [w:] Gastric Inhibition. Reports from a Dumex at Lysebu. Oslo, 5th—7th Scand. J. Gastroenterology 11, suppl. 42, 63, 1976.
 14. Zarzycki W.: Regulacja wydzielania śluzu żołądkowego. *Post. Hig. Med. Dośw.* 38, 335, 1984.
 15. Zwierz K., Gindzieński A.: Biosynteza glikoproteidów żołądkowych. *Post. Hig. Med. Dośw.* 31, 627, 1977.
 16. Zwierz K., Gindzieński A.: Sposoby uzyskiwania materiału do badań biochemicznych błony śluzowej żołądka. *Post. Hig. Med. Dośw.* 35, 189, 1981.

Otrzymano 1986.09.16.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Żołądek i dwunastnica szczura z grupy S₄. Makroskopowo widoczne liczne wrzody w części gruczołowej żołądka.

Ryc. 2. Wrzód żołądka u szczura z grupy S₄. Barwienie hematoksyliną i eozy-ną. Pow. ok. 50X.

Ryc. 3. Żołądek szczura z grupy kontrolnej. Barwienie PAS metodą McManusa. Pow. ok. 100X.

Ryc. 4. Żołądek szczura z grupy S₂. Widoczny rozpad komórek śluzowych z marginacją śluzu. Barwienie PAS metodą McManusa. Pow. ok. 200X.

Ryc. 5. Żołądek szczura z grupy S₄. W pobliżu wrzodu żołądka zniknięcie komórek śluzowych z resztkami rozpadających się mukocytów. Barwienie PAS metodą McManusa. Pow. ok. 100X.

Ryc. 6. Dwunastnica szczura z grupy kontrolnej. Barwienie PAS metodą McManusa. Pow. ok. 200X.

Ryc. 7. Dwunastnica szczura z grupy S₄. Grupowanie się komórek śluzowych w gruczołach ze zmniejszaniem ich ilości na szczytach kosmków. Widoczne również wydzielanie dużej ilości śluzu z mukocytami do światła jelita. Barwienie PAS metodą McManusa. Pow. ok. 100X.

РЕЗЮМЕ

Белые крысы — самцы подвергались действию сильного стресса иммобилизации при низкой температуре в течение от 1 до 40 часов. Наблюдались усиливающиеся во время стресса морфологические изменения в слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишке. В желудке доходило до появления острых язв. В обоих органах существенные изменения были видны в количестве и морфологии слизистых клеток и слизи. В желудке развивался быстрый распад слизистых клеток с маргинацией слизи. А в двенадцатиперстной кишке наблюдалось скопление мукоцитов в железах с исчезновением их с вершущек ворсинок.

SUMMARY

The white male rats were exposed to experimental conditions — immobilization stress in low temperature from 1—4 hrs. Morphological changes, increasing after longer stress, in mucosa of the stomach and duodenum were observed. Stress induced acute gastric ulcers were found in the stomach. Very important changes in the morphology and quantity of mucocytes and mucus could be detected in both organs. Mucocytes in the stomach disintegrated very quickly with margination of mucus. In the duodenum an aggregation of mucocytes in the glands were observed, their number being reduced on the apex of villi.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Stomach and duodenum of rat from S_4 group. Many macroscopic ulcers in the gland's part of stomach.

Fig. 2. Stomach ulcer in rat from S_4 group. Staining with hematoxylin and eosin. Magn. ca 50X.

Fig. 3. Stomach of rat from control group. Staining according to PAS method by McManus. Magn. ca 100X.

Fig. 4. Stomach of rat from S_2 group. Disintegration of mucocytes with margination of mucus. Staining according to PAS method by McManus. Magn. ca 200X.

Fig. 5. Stomach of rat from S_4 group. Disappearance of mucocytes close by the ulcer of stomach. Staining according to PAS method by McManus. Magn. ca 100X.

Fig. 6. Duodenum of rat from control group. Staining according to PAS method by McManus. Magn. ca 200X.

Fig. 7. Duodenum of rat from S_4 group. Assemblation of mucocytes in the glands, reduction of their number on the apex of villi. Secretion of a lot of mucus with mucocytes to bore of intestine. Magn. ca 100X.

