

WPŁYW SELENU I WITAMINY E NA PARAMETRY MORFOLOGICZNE I MUKOPOLISACHARYDY JELITA CZCZEGO W DOŚWIADCZALNEJ WŁOŚNICY MYSZY

MAREK HOUSZKA

Katedra Anatomii Patologicznej i Weterynarii Sądowej AR Wrocław

Wewnętrzna powierzchnia błony śluzowej przewodu pokarmowego utworzona jest z dwuskładnikowej bariery, której jednym elementem jest żel śluzowy, a drugim szybko regenerujące komórki nabłonka [7]. Budowa oraz funkcje nabłonka są stosunkowo dobrze poznane, natomiast skład oraz funkcje śluzu pozostają wciąż jeszcze niejasne. Śluz stanowi przede wszystkim doskonały smar zabezpieczający delikatny nabłonek przed uszkodzeniem [1, 4]. Jest on ponadto podłożem dla wielu substancji i związków aktywnych oraz komórek. Ma zdolność wiązania znacznej ilości wody, jonów wapnia i żelaza, wiązania i inaktywacji toksyn [1]. Utrudnia przenikanie drobnoustrojów i makromolekuł do receptorów błony plazmatycznej nabłonka. Śluz pokrywający błonę śluzową jelita pozostaje w stanie dynamicznej równowagi, jest bowiem wciąż trawiony od strony powierzchni, a z drugiej strony odtwarzany przez komórki błony śluzowej [19]. Zachwianie tego stanu równowagi jest bezpośrednią przyczyną wielu stanów patologicznych. W przebiegu różnych inwazji pasożytniczych (robaczyce, kokcydioza) obok zmian architektury błony śluzowej [2, 14] następuje wzmożona produkcja i sekrecja śluzu [18]. Ma to również miejsce w przebiegu jelitowej fazy włośnicy. Celem przeprowadzonych badań była szczegółowa analiza dynamiki reakcji komórek kubkowych jelita w przebiegu doświadczalnego zarażenia włośniami oraz wpływu selenu i witaminy E na przebieg tego zarażenia.

Materiał i metody

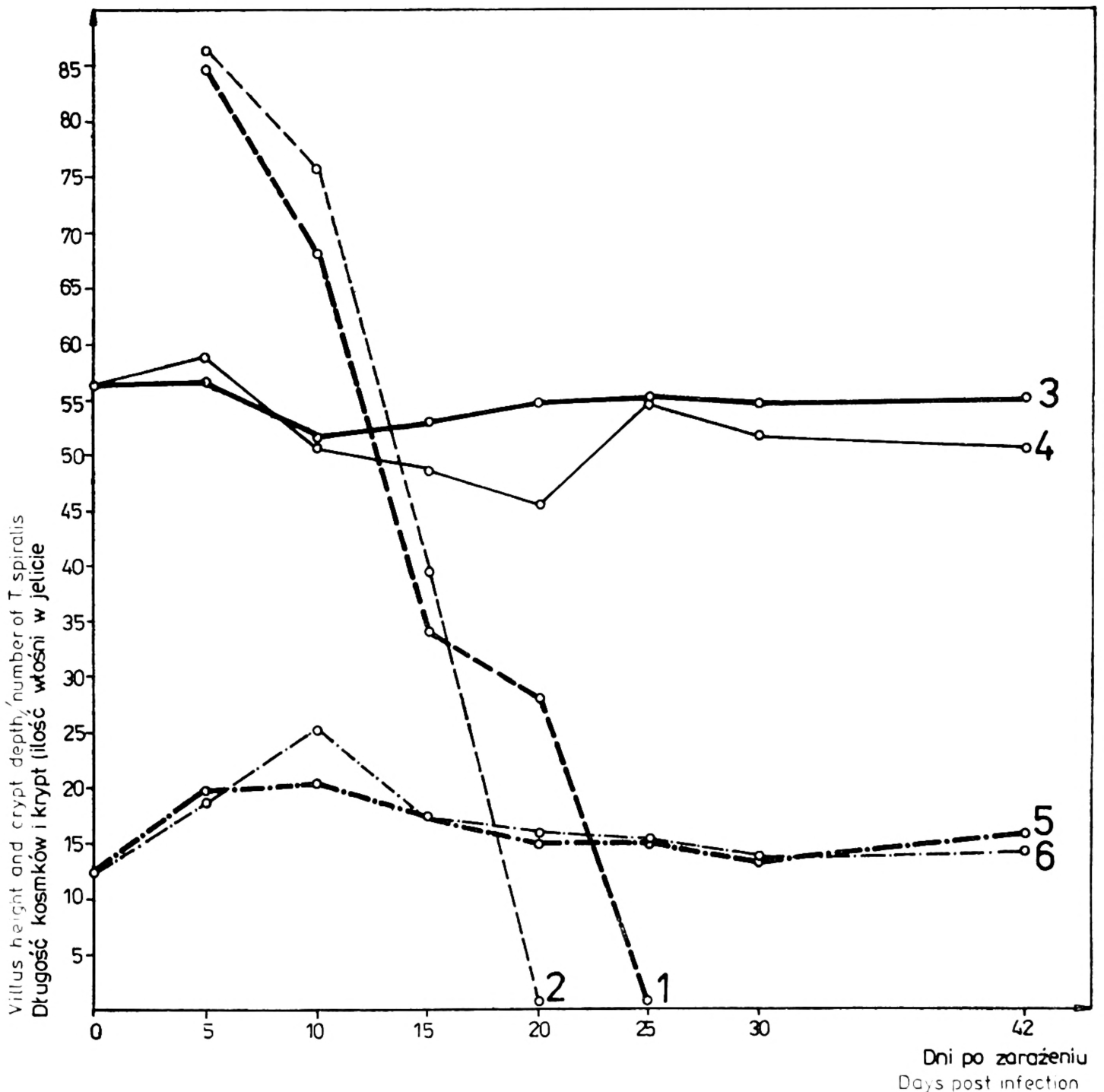
Badania przeprowadzono na myszach szczepu CFW, samcach i samicach o wadze około 20 g. Grupę I — kontrolną stanowiło 45 myszy zarażonych włośniami w ilości 200 larw *T. spiralis*/mysz. Grupę II — stanowiło 45 myszy zarażonych *T. spiralis* i otrzymujących preparat

„Evetsel” produkcji „Polfa”, w ilości 0,005 mg/mysz w iniekcji podskórnej co 5 dni przez cały okres doświadczenia. Myszy zabijano przed zarażeniem, a następnie 5, 10, 15, 25, 30 i 42 dnia po zarażeniu. Bezpośrednio po zabiciu pobierano wycinek jelita czczego długości 0,5 cm w odległości 10 cm od odźwiernika i utrwalano przez 24 godz. w 10% roztworze formaliny z dodatkiem 0,7% chlorku cetylopirydyniowego. Preparaty parafinowe barwiono rutynowo hematoksyliną i eozyną, a ponadto AB — pH 1,0 i AF dla wykrycia sulfomucyn [17], AF + AB — pH 2,5 dla różnicowania sulfo- i sialomucyn [8] i metodą PAS dla wykrycia mucyn obojętnych [13]. W preparatach barwionych HE dokonano przy pomocy mikrometru okularowego pomiarów wysokości kosmków oraz głębokości gruczołów jelitowych (obj. 5×, okular 10×). W preparatach barwionych na obecność śluzu liczono dodatnio reagujące komórki kubkowe w nabłonku krypt i kosmków. W każdym preparacie dokonywano pomiarów oraz liczono komórki kubkowe średnio w 15 zespołach krypta—kosmek; po kilkunastu dniach pomiary powtarzano. Z przeprowadzonych pomiarów obliczano średnią. Pozostałą część jelita cienkiego rozdrabniano i inkubowano w płynie fizjologicznym w temp. 39°C przez 24 godz. w celu wyizolowania włśni.

Wyniki badań

Z 200 larw *T. spiralis* podanych myszom w dniu rozpoczęcia doświadczenia, do 5-go dnia zachowała się w jelicie mniej niż połowa (ryc. 1). W okresie między 5 a 10 dniem usuwanie włśni było w obu grupach znikome. Dopiero począwszy od 10 dnia gwałtownie wzrosło usuwanie włśni; u myszy otrzymujących Evetsel, trwało ono nieprzerwanie do 20 dnia, doprowadzając do całkowitego uwolnienia jelita od włśni. U zwierząt kontrolnych pomiędzy 15 a 20 dniem obserwacji, usuwanie włśni uległo z nieznanых powodów zahamowaniu i dopiero między 20 a 25 dniem następował drugi etap doprowadzający do całkowitego ich usunięcia.

Obecność *T. spiralis* w jelicie wywołuje obserwowane od 5-go dnia po zarażeniu zjawisko skracania kosmków. U zwierząt kontrolnych było ono tylko słabo zaznaczone i począwszy od 10-go dnia kosmki stopniowo odzyskiwały pierwotną wysokość. Natomiast u zwierząt otrzymujących Evetsel skrócenie kosmków było znacznie wyraźniejsze i trwało dłużej bo aż do 20 dnia po zarażeniu, czyli do całkowitego usunięcia włśni z jelita. Dopiero wtedy następowała szybka odbudowa kosmków. W przeciwieństwie do opisanych zmian zjawisko wydłużania gruczołów jelitowych obserwowano już od samego początku inwazji; trwało ono nieprzerwanie do 10 dnia, tj. do rozpoczęcia „expulsion”, kiedy to gruczoły



Ryc. 1. Wielkość kosmków i gruczołów jelitowych w przebiegu zarażenia — *T. spiralis*

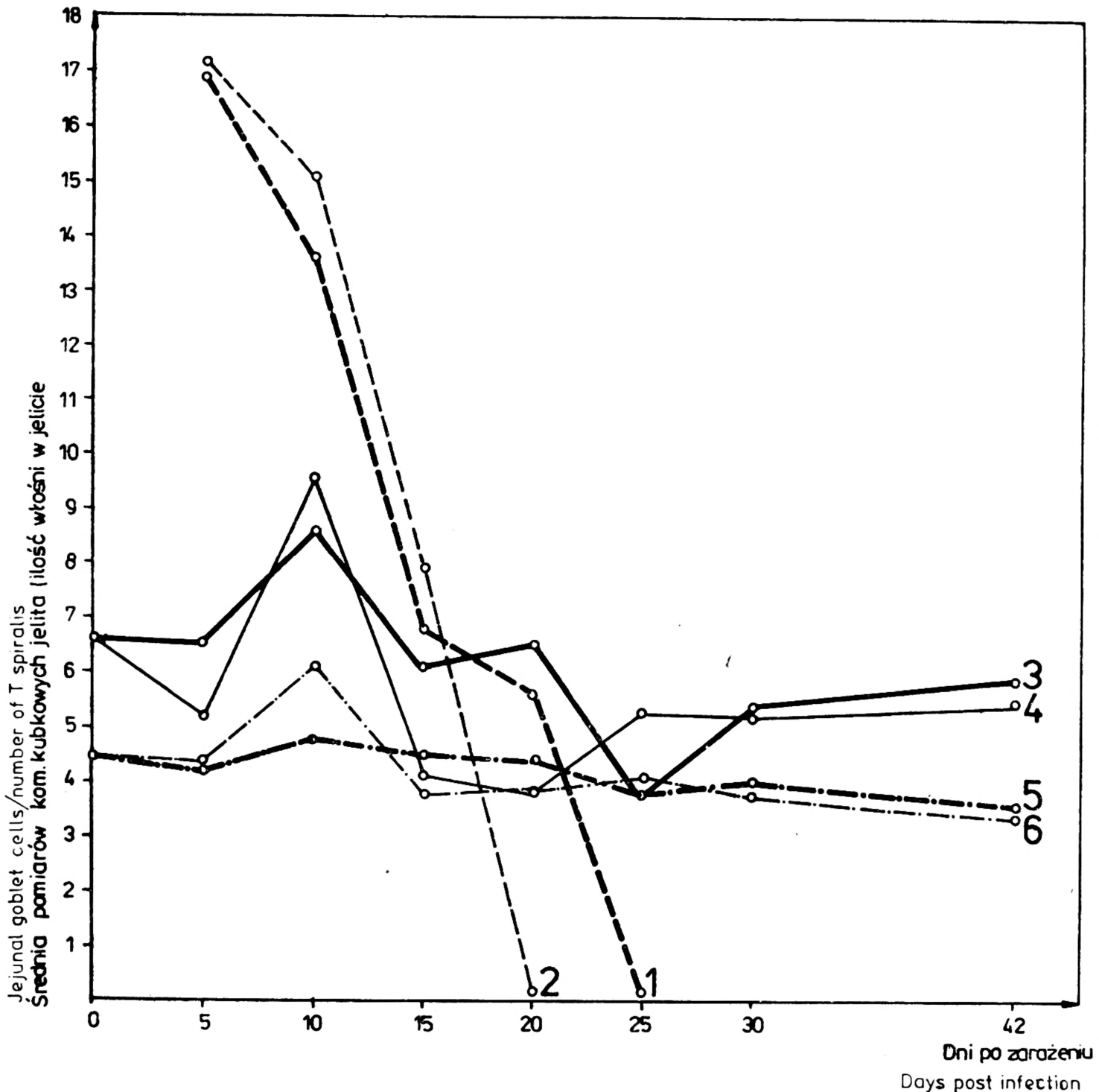
1 — ilość włośni u myszy kontrolnych; 2 — ilość włośni u myszy otrzymujących Evetsel; 3 — długość kosmków u myszy kontrolnych; 4 — długość kosmków u myszy otrzymujących Evetsel; 5 — głębokość gruczołów jelitowych u myszy kontrolnych; 6 — głębokość gruczołów jelitowych u myszy otrzymujących Evetsel

Fig. 1. Villus and crypt size during *T. spiralis* infection

1 — number of intestinal trichinellae in control mice; 2 — number of intestinal trichinellae in mice receiving Evetsel; 3 — villus length in control mice; 4 — villus length in mice receiving Evetsel; 5 — crypt depth in control mice; 6 — crypt depth in mice receiving Evetsel

jelitowe osiągnęły największą głębokość. Zmiany te były zdecydowanie wyraźniej zaznaczone w grupie zwierząt otrzymujących Evetsel. Od tej chwili w obu grupach gruczoły jelitowe ulegały stopniowemu skracaniu i 30 dnia osiągnęły głębokość wyjściową.

Obecność włośni w jelicie wywołuje także zmiany w nabłonku błony



Ryc. 2. Zmiany liczby komórek kubkowych jelita czczego w przebiegu zarażenia *T. spiralis*

1 — ilość włośni u myszy kontrolnych; 2 — ilość włośni u myszy otrzymujących Evetsel; 3 — ilość komórek kubkowych w kosmkach myszy kontrolnych; 4 — ilość komórek kubkowych w kosmkach myszy otrzymujących Evetsel; 5 — ilość komórek kubkowych w gruczołach jelitowych myszy kontrolnych; 6 — ilość komórek kubkowych w gruczołach jelitowych myszy otrzymujących Evetsel

Fig. 2. Changes in jejunal goblet cells number during *T. spiralis* infection
 1 — number of intestinal trichinellae in control mice; 2 — number of intestinal trichinellae in mice receiving Evetsel; 3 — goblet cells in the villuses of control mice; 4 — goblet cells in the villi of mice receiving Evetsel; 5 — goblet cells in the crypts of control mice; 6 — goblet cells in the crypts of mice receiving Evetsel

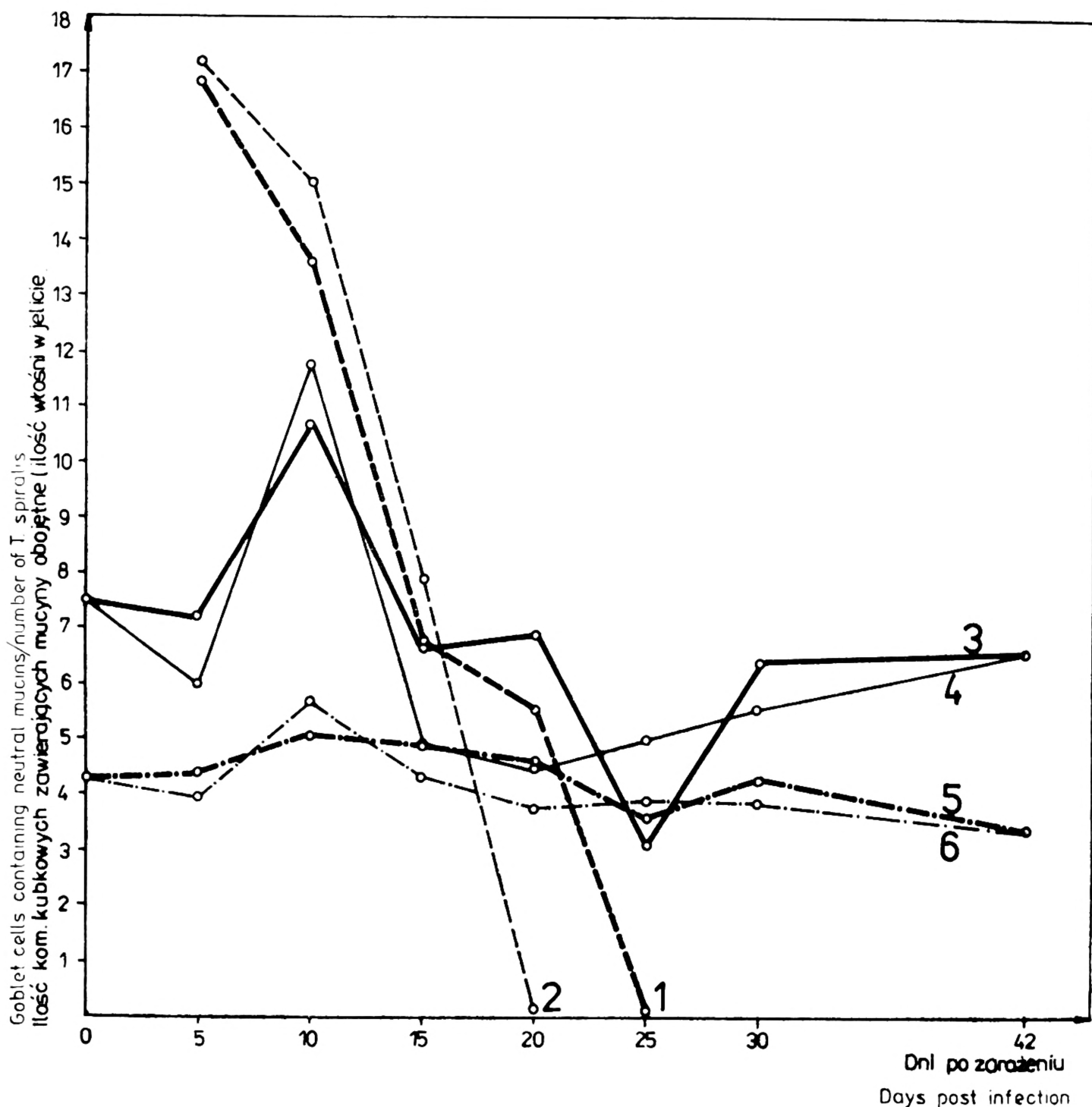
śluzowej (ryc. 2). W okresie pierwszych 5 dni po zarażeniu liczba komórek kubkowych w kosmkach jelita zwierząt kontrolnych pozostawała niezmienną, natomiast u zwierząt otrzymujących Evetsel ulegała znacznemu obniżeniu. Pomiedzy 5 a 10 dniem komórek kubkowych w kosm-

kach zwierząt obu grup gwałtownie przybywało, a w fazie „expulsion”, tj. pomiędzy 10-15 dniem ubywało. U zwierząt otrzymujących Evetsel liczba komórek kubkowych w nabłonku kosmków była 10 dnia znacznie większa niż u zwierząt kontrolnych, a spadek obserwowany 15 dnia znacznie silniejszy. W grupie zwierząt kontrolnych uwalnianie wydzieliny śluzowej z komórek kubkowych kosmków, a co za tym idzie zmniejszenie się ich liczby, przebiegało wolniej. Pomędzy 15 a 20 dniem obserwacji zjawisko to ulegało znacznemu zwolnieniu. W okresie tym stwierdzono także znaczne zwolnienie usuwania włśni z jelita. W gruczołach jelitowych myszy otrzymujących Evetsel liczba komórek kubkowych podobnie jak w kosmkach najpierw wyraźnie wzrosła, a następnie uległa zmniejszeniu pomiędzy 10 a 15 dniem, podczas kiedy u zwierząt kontrolnych zjawisko to było ledwie dostrzegalne.

Komórki kubkowe jelita czczego wydzielają różnego typu substancje śluzowe. W kosmkach badanych zwierząt najwięcej było komórek zawierających sulfomucyny i mucyny obojętne, znacznie zaś mniej komórek zawierających sialomucyny. Obserwowane zarówno u zwierząt doświadczalnych jak i kontrolnych zmiany w ogólnej liczbie komórek kubkowych nie wpłynęły jednak na zachwianie proporcji pomiędzy komórkami zawierającymi mucyny obojętne, a zawierającymi sulfomucyny (ryc. 3, ryc. 4). Komórki zawierające sialomucyny były stosunkowo nieliczne i niewielkie były także zmiany w ich liczbie. Szczególnie w okresie pomiędzy 15 a 25 dniem liczba ich pozostawała na stałym poziomie (ryc. 5).

Dyskusja

Przeprowadzone badania morfometryczne wykazały, że obecność *T. spiralis* w jelicie czczym doprowadza do skrócenia kosmków jelitowych oraz wydłużenia gruczołów jelitowych, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami i towarzyszy wielu innym chorobom pasożytniczym jelita [2, 13]. W grupie kontrolnej zjawiska te były stosunkowo słabo zaznaczone i krótkotrwałe, natomiast wyraźne u zwierząt otrzymujących Evetsel. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że rozrost gruczołów jelitowych wyprzedzał zjawisko skracania kosmków. Można więc przypuszczać, że rozrost gruczołów jest następstwem bezpośredniego działania włśni, a nie uszkodzenia i złuszczenia komórek nabłonka kosmków, co jak wiadomo w mechanizmie fizjologicznych procesów regulacyjnych jest bodźcem indukującym proliferację nabłonka gruczołów jelitowych. Ponadto obserwowany rozrost gruczołów wynikał nie tyle z proliferacji komórek strefy rozrodczej co raczej namnożenia się komórek kubkowych. Nie był to zatem wstępny etap regeneracji kosmków, lecz faza przygo-

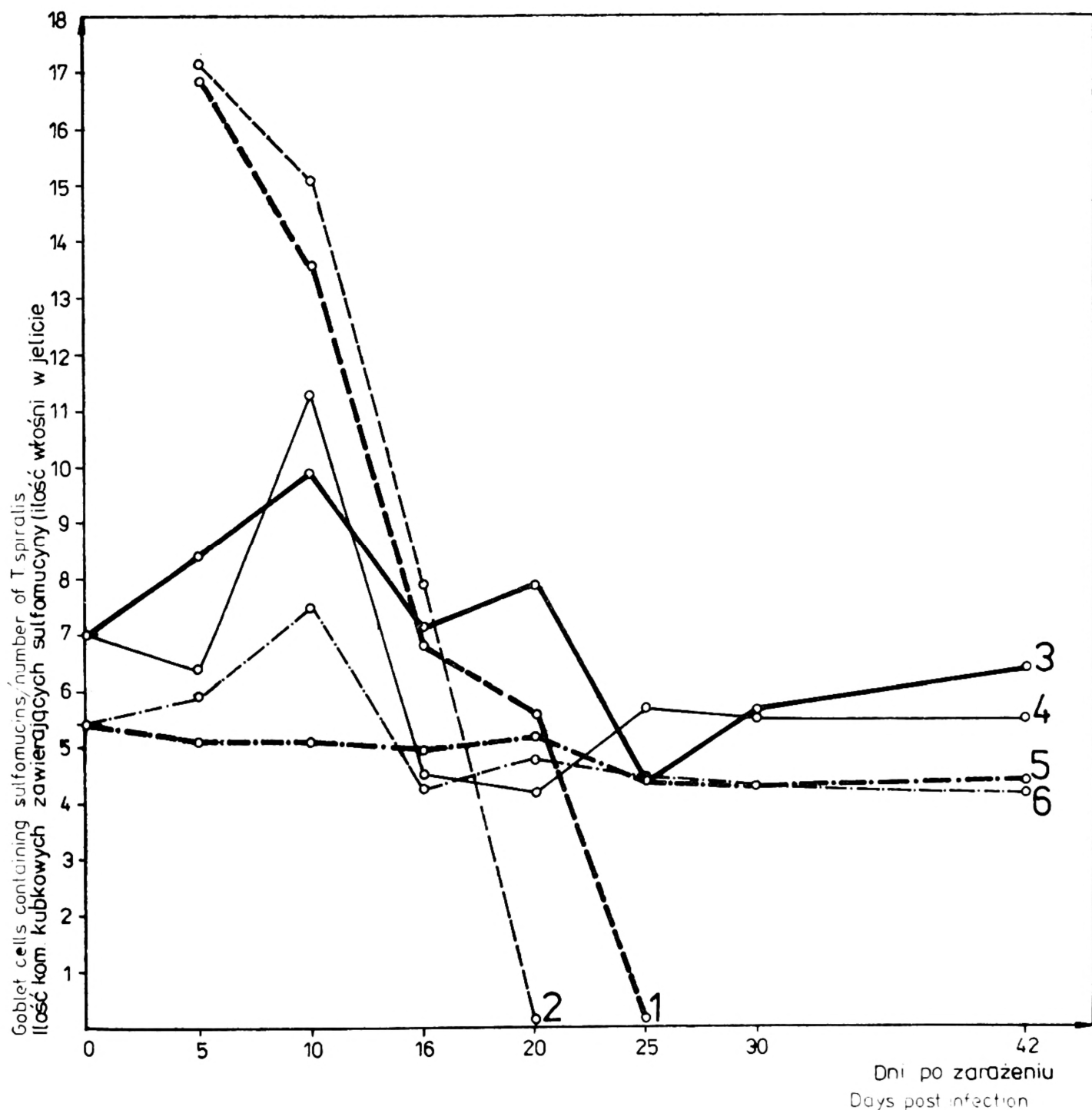


Ryc. 3. Zmiany liczby komórek kubkowych zawierających mucyny obojętne w przebiegu zarażenia *T. spiralis* (opis porównaj Ryc. 2)

Fig. 3. Changes in number of goblet cells containing neutral mucus during *T. spiralis* infection (explanation as in Fig. 2)

towawcza procesu „expulsion”. Przeprowadzone badania wykazały ograniczoną zbieżność pomiędzy dynamiką usuwania włośni, a wielkością kosmków i gruczołów jelitowych. Tylko u zwierząt otrzymujących Evet-sel stwierdzono stopniowe skracanie kosmków, aż do całkowitego usunięcia włośni z jelita.

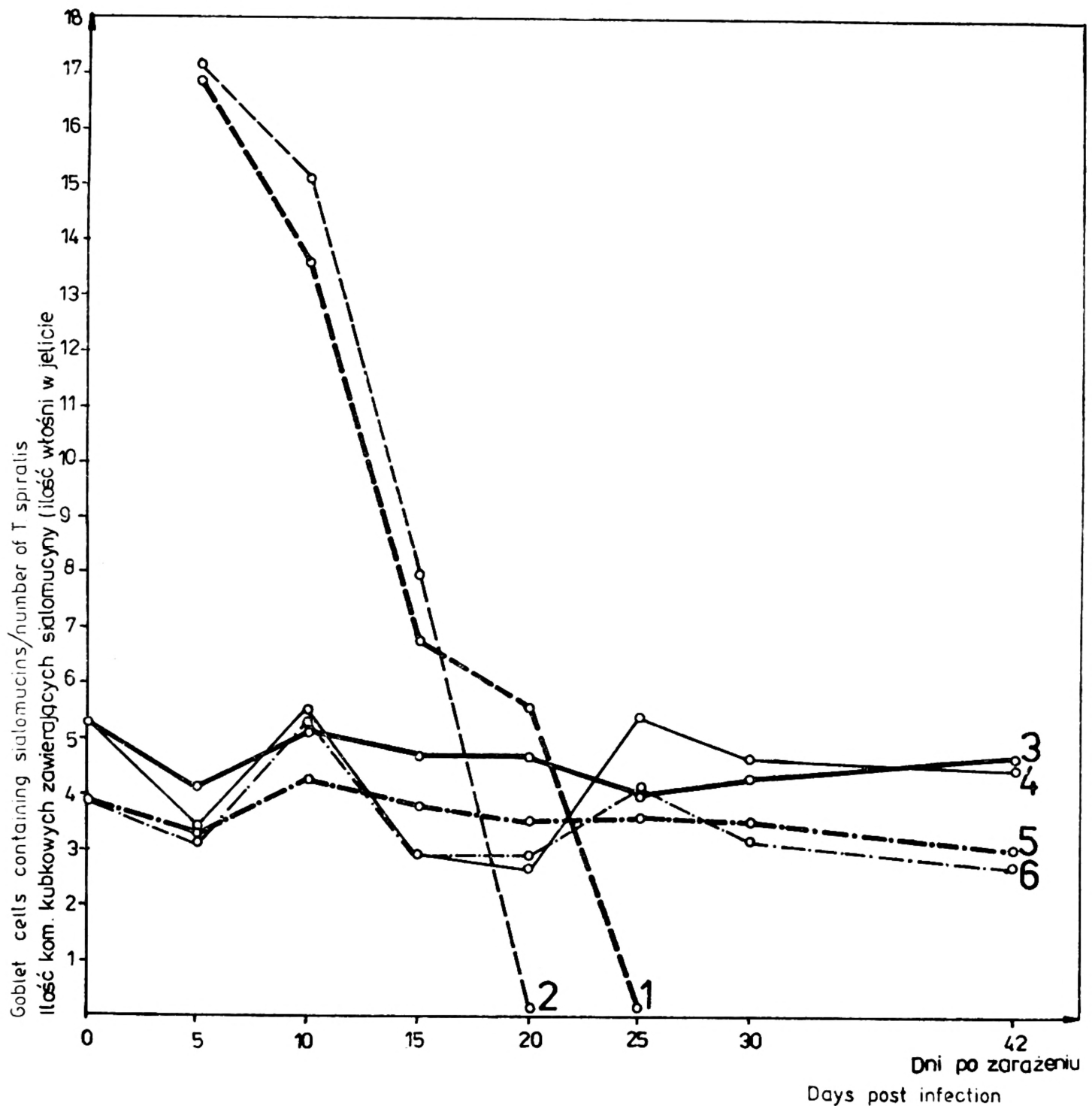
Stałym elementem reakcji błony śluzowej jelita w przebiegu włośnicy była proliferacja komórek kubkowych i wzmożona produkcja śluzu. Rola śluzu w procesie usuwania robaków z jelita wciąż jeszcze nie jest w pełni wyjaśniona. Część autorów przypisuje mu główne znaczenie



Ryc. 4. Zmiany liczby komórek kubkowych zawierających sulfomucyny w przebiegu zarażenia *T. spiralis* (opis porównaj Ryc. 2)

Fig. 4. Changes in number of goblet cells containing sulfomucins during *T. spiralis* infection (explanation as in Fig. 2)

w tym procesie [18]. Ostatnio przeważał pogląd, że decydujące znaczenie odgrywają tu mechanizmy immunologiczne powodujące uszkodzenie pasożyta, który jest następnie usuwany przy wzmożonym wydzielaniu śluzu [9]. Miller [12] podając zwierzętom limfocyty oraz surowicę odpornościową, wykazał że rzeczywiście mechanizmy immunologiczne odgrywają istotną rolę w procesie „expulsion”. Nie prowadzą one jednak do bezpośredniego uszkodzenia pasożyta, lecz działają pośrednio, indukując nieswoiste mechanizmy obronne, m. in. intensyfikując różnicowanie komórek kubkowych. Wyniki badań własnych wydają się potwierdzać tę ostatnią koncepcję. U zwierząt kontrolnych nie otrzymujących Evetselu



Ryc. 5. Zmiany liczby komórek kubkowych zawierających sialomucyny w przebiegu zarażenia *T. spiralis* (opis porównaj Ryc. 2)

Fig. 5. Changes in number of goblet cells containing sialomucins during *T. spiralis* infection (explanation as in Fig. 2)

zbieżność pomiędzy uwalnianiem śluzu, a usuwaniem włośni była bardzo ścisła, a to mogłoby wskazywać na dominującą rolę śluzu w procesie „expulsion”. Jednak u zwierząt otrzymujących Evetsel zbieżność ta została zakłócona, co było szczególnie wyraźnie widoczne pomiędzy 10 a 15 oraz 15 a 20 dniem po zarażeniu. Wszystko to wydaje się sugerować, że wzmożenie wydzielania śluzu jest tylko jednym z mechanizmów zaangażowanych w zjawisku „expulsion”. Mechanizmy te są ściśle ze sobą skorelowane i dlatego liczba komórek kubkowych jest dobrym wskaźnikiem intensywności reakcji obronnej błony śluzowej. Selen i wit. E, stymulując nierównomiernie poszczególne mechanizmy obronne dopro-

wadzają przypuszczalnie do zachwiania normalnej korelacji, co pozwala na ujawnienie udziału w zjawisku „expulsion” także innych niż wydzielanie śluzu, mechanizmów obronnych. W śluzie wydzielanym w jelicie cienkim myszy dominują sulfomucyny oraz mucyny obojętne; natomiast ilość sialomucyn jest niewielka [15]. Z wcześniejszych doniesień wynika, że skład komórek produkujących poszczególne rodzaje śluzu w przebiegu przewlekłych procesów zapalnych, może ulegać znacznym zmianom [20]. Badania własne wykazały, że w zarażeniu *T. spiralis*, pomimo silnej mobilizacji komórek kubkowych, proporcje pomiędzy poszczególnymi typami komórek pozostawały w zasadzie niezmienione. Także podanie wit. E z selenem, mocno stymulujące mobilizację tych komórek, nie wpłynęło na zmianę ich wzajemnych proporcji, a co za tym idzie przypuszczalnie także i składu wydzielanego śluzu. Niejasny pozostaje wciąż jeszcze mechanizm oddziaływania selenu i wit. E na reakcje obronne błony śluzowej. Badania ostatnich lat wskazują na to, że obie te substancje stymulują nie tylko mechanizmy immunologiczne [3, 6, 10, 11, 16], lecz wywierają także znaczący wpływ na nieswoiste mechanizmy obronne [3, 5]. Jednym z nich jest mobilizacja komórek kubkowych i uwalnianie z nich śluzu.

Wnioski

1. Rozrost gruczołów jelitowych rozpoczynający się bezpośrednio po zarażeniu jest rezultatem bezpośredniego działania włośni, a nie wtórną reakcją adaptacyjną na skrócenie kosmków jelitowych, które występuje dopiero po kilku dniach.

2. Rozrost gruczołów jelitowych, uwarunkowany w głównej mierze proliferacją komórek kubkowych, należy uznać przede wszystkim jako fazę przygotowawczą procesu „expulsion”, a nie jako wstępny etap regeneracji kosmków.

3. Selen wraz z witaminą E stymulują mobilizację, a następnie uwalnianie śluzu nie tylko w nabłonku kosmków ale również w nabłonku gruczołów jelitowych.

4. Dynamika proliferacji i uwalniania śluzu z komórek kubkowych wykazuje u zwierząt kontrolnych ścisłą zbieżność z szybkością usuwania *T. spiralis* z jelita; u zwierząt otrzymujących Evetsel zbieżność ta zostaje częściowo zakłócona.

5. Gwałtowne zmiany w syntezie i sekrecji śluzu w przebiegu procesu „expulsion”, nie zaburzają wzajemnych proporcji liczbowych komórek produkujących sulfomucyny, mucyny obojętne i sialomucyny.

Otrzymano: 16 IX 1986

Adres autora:

ul. C. Norwida 31, 50-375 Wrocław

LITERATURA

1. Allen, A.: Structure and function of gastrointestinal mucus. In: Physiology of the gastrointestinal tract. Ed. Johnson, L. R., New York, Raven Press, 617-657, 1981.
2. Barker, I. K.: Pathogenesis of gastrointestinal parasitism. — OVA Conference, Toronto, 1977.
3. Colnago, G. L., Jensen, L. S., Long, P. L.: Effect of selenium and vit. E on the development of immunity to coccidiosis in chickens. — *Poultry Sci.*, 63, 1136-1143, 1984.
4. Florey, H. W.: The secretion and function of intestinal mucus. — *Gastroenterology*, 43, 326-329, 1962.
5. Gyang, E. O., Stevens, J. B., Olson, W. G., Tsitsamis, S. D., Usenik, E. A.: Effects of selenium-vit. E injections on bovine polymorphonucleated leukocytes phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. — *Am. J. Vet. Res.*, 45, 175-178, 1984.
6. Heinzerling, R. H., Nockels, C. F., Quarles, C. L., Tengerdy, R. P.: Protection of chicks against *E. coli* infection by dietary supplementation with vitamin E. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 146, 279-283, 1974.
7. Hollander, F.: The two component mucus barrier. — *Arch. Intern. Med.*, 93, 107-120, 1954.
8. Lamb, D., Reid, L.: Histochemical types of acid glycoprotein produced by mucous cells of the tracheobronchial glands in man. — *J. Path.*, 98, 213-218, 1969.
9. Love, R. J., Ogilvie, B. M., McLaren, D. J.: The immune mechanism which expels the intestinal stage of *Trichinella spiralis* from rats. — *Immunology*, 30, 7-15, 1976.
10. Marsh, J. A., Dietert, R. R., Combs, G. F.: Influence of dietary selenium and vitamin E on the humoral immune response of the chick. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 166, 228-236, 1981.
11. Marsh, J. A., Dietert, R. R., Combs, G. F.: Effects of dietary deficiencies of vit. E and selenium on primary lymphoid organs of the chick. — *Fed. Proc.*, 41, 341-347, 1982.
12. Miller, H. R. P., Nawa, Y.: Immune regulation of the intestinal goblet cell differentiation. — *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 21, 31-45, 1979.
13. Pearse, A. G. E.: Histochemistry, theoretical and applied. — J. A. Churchill Ltd., London, 1967.
14. Pout, D. D.: Villous atrophy and coccidiosis. — *Nature*, 21, 45-47, 1967.
15. Sheahan, D. G., Jervis, H. R.: Comparative histochemistry of gastrointestinal mucosubstances. — *J. Anat.*, 146, 103-132, 1976.
16. Spallholz, J. E., Martin, J. L., Gerlach, M. L., Heinzerling, R. H.: Immunologic responses of mice fed diet supplemented with selenite selenium. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 143, 685-689, 1973.
17. Spicer, S. S.: A correlative study of histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. — *J. Histochem. Cytochem.*, 8, 18-26, 1960.
18. Uber, C. L., Rath, R. L., Levy, D. A.: Expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* by mice deficient in mast cells. — *Nature*, 287, 226-228, 1980.
19. Variyam, E. P., Hoskins, L. C.: Mucin degradation in human colon ecosystems. — *Gastroenterology*, 81, 751-758, 1981.
20. Wheeldon, E. B., Pirie, H. M., Breeze, R. G.: A histochemical study of the tracheobronchial epithelial mucosubstances in normal dogs and dogs with chronic bronchitis. — *Folia vet. lat.*, 6, 45-58, 1976.

THE INFLUENCE OF SELENIUM AND VIT. E ON MORPHOLOGICAL
FEATURES AND JEJUNAL MUCOPOLISACCHARIDES IN EXPERIMENTAL
TRICHINELLOSIS OF MICE

M. HOUSZKA

by

The experiment was carried on 3-month old mice CFW weighing 20 g. each. Group I — control, made 45 mice infected with 200 larvae of *T. spiralis* per a mouse. Group II — experimental, made 45 mice infected with *T. spiralis* and receiving drug "Evtsetl" including selenium and vit. E (0.005 mg per a mouse in subcutaneous injections every 5 days). The animals were killed 5, 10, 15, 25, 30 and 42 days after infection. In histologic slides of jejunum, morphometric examination of the mucosal membrane was done as well as counting of goblet cells containing neutral mucus, sulfomucins and sialomucins. The examinations showed that intestinal crypt hyperplasia which start immediately after infection and overtake the shortening of the villi is the result of direct action of *T. spiralis* and not secondary adaptation reaction on the shortening of the villi. Furthermore crypt hyperplasia conditioned mainly by goblet cells proliferation should be taken first of all as the initial stage of expulsion and not as introductory stage of villous regeneration. In mice receiving Evtsetl the goblet cells reaction was evidently stronger. However there was not as clear correlation with worm expelling, as in control mice. It seems that mobilization and secretion of mucin by goblet cells is here only one of nonspecific defence mechanisms. It is however a good marker of defence mechanism intensity of the mucosal membrane. Despite of great fluctuation of the goblet cells number, the quantity proportions between cells containing sulfomucins, neutral mucus, and sialomucins in principle remained unchanged throughout the experiment.