

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

Barbara CISZEWSKA-POPIOŁEK,
Grażyna RZESZOWSKA

Badania histochemiczne łożyska szczurów białych w warunkach doświadczalnych

Гистохимические исследования плаценты белых крыс в лабораторных
исследованиях

Histochemical Research on Albino Rat Placentas in Experimental Conditions

Wymiana substancji odżywczych, gazów oraz wydaliny między matką a płodem zachodzi poprzez warstwę kosmków łożyskowych, które oddzielają krew matki znajdującą się w przestrzeni międzykosmkowej od krwi płodowej zawartej w kapilarach kosmków. Warstwa ta stanowi barierę łożyskową. Stopień przenikania przez barierę łożyskową jest różny, ponieważ cechuje ją wysoka specyficzność i selektywność. Szybkość przenikania poszczególnych substancji, np. leków, jest różna, co wiąże się z niejednakowym mechanizmem ich transportu przez łożysko. Nie znaleziono prac, które by dotyczyły przechodzenia gryzeofulwiny lub jej metabolitów przez łożysko. W związku z tym nie jest znane zachowanie się bariery łożyskowej wobec wymienionego leku. Wydawało się celowe przeanalizowanie aktywności adenozynotrójfosfatazy i fosfatazy zasadowej biorącej udział w transporcie czynnym, fosfatazy kwaśnej — wyznacznika enzymatycznego lizosomów i dehydrogenazy mleczanowej reprezentującej beztlenową drogę przemiany materii w łożysku samic, którym podawano gryzeofulwinę w okresie ciąży.

Gryzeofulwina (Grisovin, Fulvicin, Gricin, Likuden, Griseofulvin) jest antybiotykiem o silnym, swoistym działaniu przeciwgrzybiczym, szeroko stosowanym w dermatologii. W postaci czynnej gromadzi się tylko w skórze właściwej i w warstwie rozrodczej naskórka, tworząc barierę gryzeofulwinową dla dermatofitów. W pozostałych tkankach i narządach szybko ulega unieczynnieniu. Opisywana jest jako lek mało toksyczny i dobrze znoszony przez pacjentów (15, 9, 18). Badania na zwierzętach wykazały, że gryzeofulwina podawana dootrzewnowo i doustnie nie wywiera żadnych objawów ubocznych, dopiero wstrzyknięta dożylnie wywołuje objawy cytotoksyczne, polegające na zahamowaniu mitoz w okresie metafazy (15). Należy jednak podkreślić, że działanie to jest przemijające i po 24 godz. następuje całkowita regeneracja komórek. Nie stwierdzono działania teratogennego gryzeofulwiny w wypadkach stosowania jej w ciąży. Jednak w ankiecie przeprowadzonej przez Götza i Reichenberga (5) wśród lekarzy-dermatologów 73,5% wy-

powiedziało się za niedopuszczalnością podawania gryzeofulwiny ciężarnym. Brak konkretnych dowodów teratogennego działania gryzeofulwiny powoduje, że problem jest dyskusyjny.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzono na 100 łożyskach pochodzących od 20 ciężarnych samic szczurów białych z własnej hodowli Zakładu. Zwierzęta karmiono mieszanką granulowaną LSM wzbogaconą jarzynami i mlekiem. Podzielone one zostały na 2 grupy: 1) kontrolna — 6 samic (30 łożysk), 2) doświadczalna — 14 samic (70 łożysk). Począwszy od 1 dnia ciąży każdej samicy z grupy doświadczalnej podawano codziennie doustnie gryzeofulwinę (Griseofulvin-forte „Medexport”) w dawce 2,5 mg, co stanowi 16,6 mg/kg c.c. 21 dnia ciąży pobierano łożyska zwierząt z grupy kontrolnej i doświadczalnej.

Reakcje enzymatyczne wykonano na materiale utrwalonym i nieutrwalonym. Jako utrwalacza używano zimnego płynu Bakera, a czas utrwalania wynosił 12 godz. Skrawki grubości ok. 10—12 μm sporządzano na mikrotomie mroźniowym. Na materiale świeżym, nieutrwalonym wykrywano jedynie aktywność dehydrogenazy mleczanowej. Natomiast reakcję na adenozynotrójfosfatę, fosfatę zasadową i fosfatę kwaśną wykonywano na materiale utrwalonym. Odczyny enzymatyczne przeprowadzono wg następujących metod: adenozynotrójfosfatę oznaczano wg metody Wachsteina i Meisela, fosfatę zasadową, fosfatę kwaśną i dehydrogenazę mleczanową wg metody Pearse'a.

BADANIA WŁASNE

F o s f a t a z a z a s a d o w a. W łożyskach zwierząt kontrolnych stwierdzono wysoką aktywność fosfatazy zasadowej w nabłonku trofoblastycznym labiryntu, w ścianach naczyń krwionośnych oraz w komórkach olbrzymich. Warstwa gąbczasta trofoblastu i doczesna podstawowa wykazywały nieznaczną reakcję enzymatyczną (ryc. 1). U zwierząt, które otrzymywały przez okres ciąży gryzeofulwinę, stwierdzono w porównaniu z grupą kontrolną zmniejszenie aktywności fosfatazy zasadowej w labiryncie. W naczyniach krwionośnych i w niektórych komórkach olbrzymich odczyn enzymatyczny pozostał nadal bardzo wyraźny (ryc. 2).

F o s f a t a z a k w a ś n a. W łożyskach szczurów kontrolnych obserwowano wysoką aktywność fosfatazy kwaśnej w labiryncie, w warstwie gąbczastej trofoblastu, w komórkach olbrzymich jak również w doczesnej podstawowej. Analizując aktywność fosfatazy kwaśnej w łożyskach zwierząt doświadczalnych nie zauważono różnic w porównaniu z kontrolą.

A d e n o z y n o t r ó j f o s f a t a z a. Najintensywniejszy odczyn na adenozynotrójfosfatę w łożyskach zwierząt kontrolnych obserwowano w nabłonku trofoblastycznym labiryntu, w naczyniach krwionośnych, natomiast znacznie słabsza reakcja występowała w warstwie gąbczastej trofoblastu w doczesnej podstawowej, a nie obserwowano jej zupełnie w komórkach olbrzymich (ryc. 3). W grupie zwierząt doświadczalnych

wykazano osłabienie reakcji na adenozynotrójfosfatazę w porównaniu z łożyskami szczurów kontrolnych. To osłabienie reakcji dotyczyło przede wszystkim warstwy gąbczastej trofoblastu (ryc. 4).

Dehydrogenaza mleczanowa. Intensywny odczyn na dehydrogenazę mleczanową występował w nabłonku trofoblastycznym labiryntu. W pozostałych elementach łożyska odczyn enzymatyczny był znacznie słabszy (ryc. 5). W łożyskach szczurów z grupy doświadczalnej aktywność dehydrogenazy mleczanowej była podobna jak w grupie kontrolnej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Łożysko spełniając różnorodne funkcje metaboliczne zabezpiecza prawidłowy rozwój płodu, jest narządem zróżnicowanym pod względem morfologicznym i histochemicznym. Wymiana produktów przez barierę łożyskową jest uzależniona od sprawnie współdziałających systemów enzymatycznych (7, 11). Najbardziej aktywnym i wrażliwym elementem strukturalnym łożyska jest trofoblast (10, 12, 6, 8). Badania aktywności adenozynotrójfosfatazy, dehydrogenaz bursztynianowej, mleczanowej i izocytrynianowej wskazują na to, że jest ona intensywna w nabłonku trofoblastycznym i w gruczołach macicy (4). Nasze obserwacje wykazują, że aktywność badanych enzymów była najsilniejsza w nabłonku trofoblastycznym. Pod wpływem podawania samicom ciężarnym gryzeofulwiny wystąpiło osłabienie reakcji na fosfatazę zasadową i adenozynotrójfosfatazę. Analizując odczyn na fosfatazę zasadową należy podkreślić, że naczynia krwionośne i niektóre komórki olbrzymie pozostały nadal enzymatycznie aktywne. W roku 1956 C a n i v e c (1) podkreślił obecność bardzo silnej reakcji na fosfatazę zasadową w komórkach olbrzymich. Rola fosfatazy zasadowej w łożysku, podobnie jak w innych narządach, związana jest z transportem aktywnym, metabolizmem węglowodanów oraz ciał tłuszczowych (4, 13, 2). Jej wysoka aktywność w trofoblaście jest podobna do obserwowanej w nabłonku jelita cienkiego i w kanałkach krętych nerki.

W przeprowadzonym przez nas doświadczeniu nie uchwycono różnic w aktywności fosfatazy kwaśnej między łożyskiem zwierząt z grup kontrolnej i doświadczalnej. Zarówno u jednych, jak i u drugich reakcja enzymatyczna była silna we wszystkich elementach łożyska. Można więc przypuszczać, że czynność tej ważnej hydrolazy lizosomalnej nie uległa zaburzeniu mimo podawania samicom ciężarnym gryzeofulwiny. C h r i s t i e (3) najwyższą aktywność fosfatazy kwaśnej opisał w nabłonku trofoblastycznym. Układ lizosomalny w łożysku stanowi barierę, która chroni przed wnikaniem obcych antygenowo białek (19).

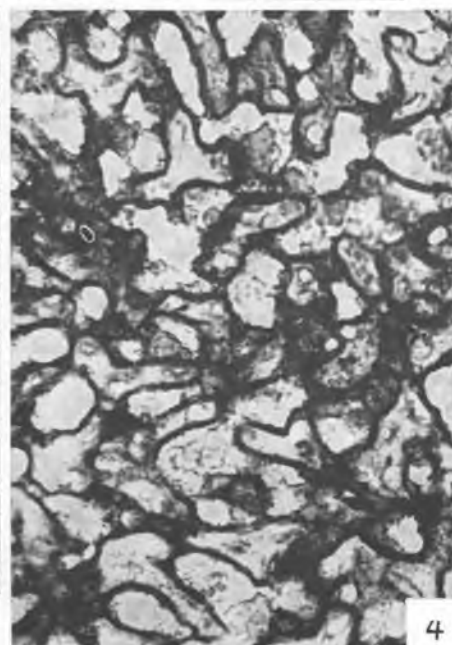
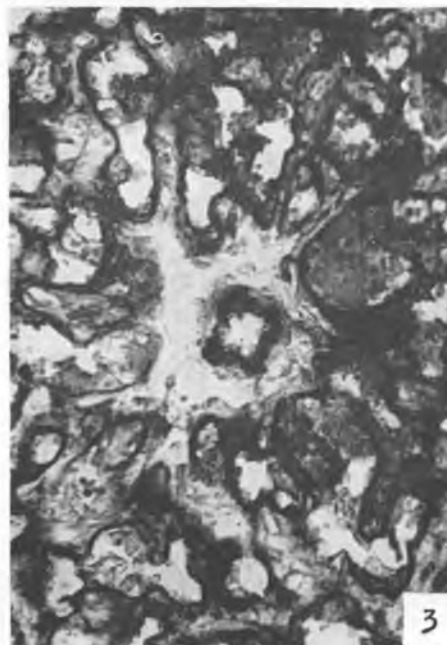
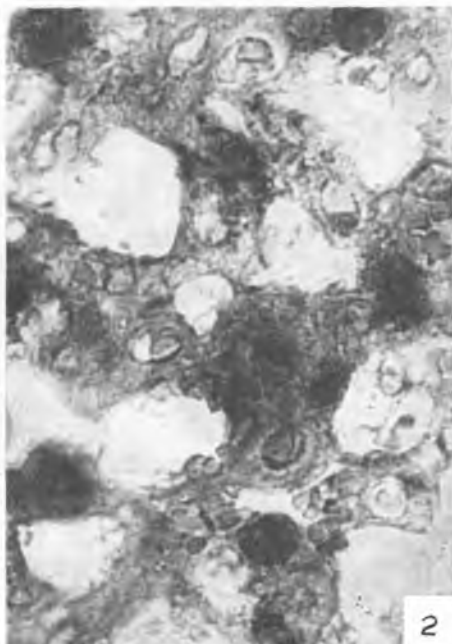
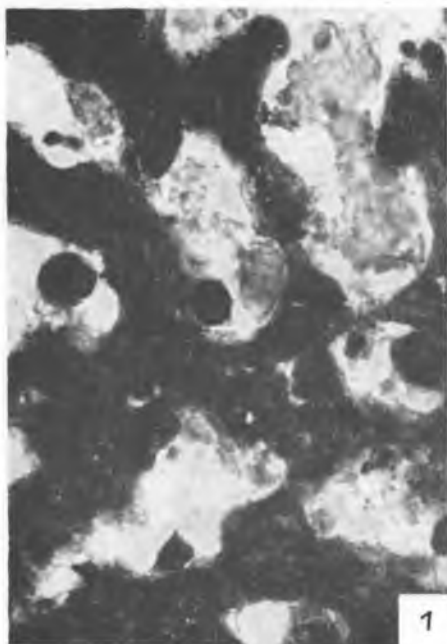
Występowanie odczynu na adenozynotrójfosfatazę opisywano w labi-

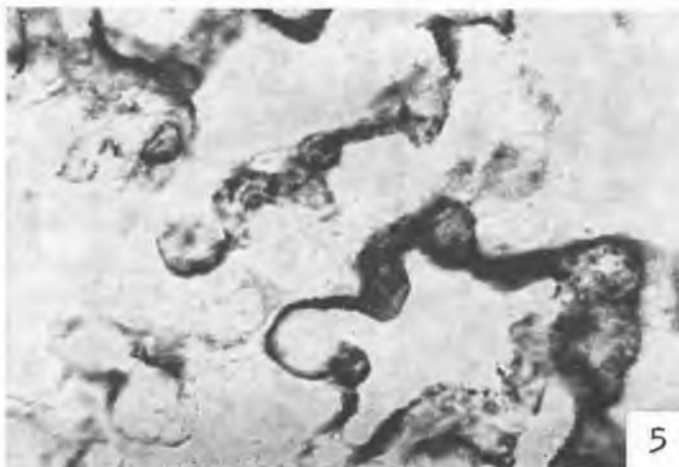
ryncie oraz w naczyniach krwionośnych (4). W naszym doświadczeniu w łożyskach zwierząt kontrolnych reakcja na adenozyntroójfosfatazę była podobna do wyżej opisanej, natomiast znacznie słabszą obserwowano w warstwie gąbczastej trofoblastu. Po zastosowaniu gryzeofulwiny zmniejszenie odczynu na adenozyntroójfosfatazę dotyczyło głównie warstwy gąbczastej trofoblastu. Obniżenie aktywności adenozyntroójfosfatazy było opisane w łożyskach samic, które otrzymywały duże dawki witaminy D₃ (14), avipron (16) i terrafun (17). Fakt ten świadczy o wystąpieniu zaburzeń związanych głównie z produkcją energii i z transportem aktywnym. Z naszego doświadczenia wynika, że gryzeofulwina tylko w niewielkim stopniu wpłynęła na procesy związane z czynnością adenozyntroójfosfatazy.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono wysoką aktywność dehydrogenazy mleczanowej w nabłonku trofoblastycznym labiryntu łożysk zwierząt kontrolnych, która nie uległa zmianie w łożyskach samic doświadczalnych. Wynika z tego, że gryzeofulwina względnie jej metabolity nie wpłynęły ujemnie na dehydrogenazę mleczanową, stanowiącą bardzo istotne ogniwo w systemie oddechowym komórek. Z przeprowadzonego eksperymentu można wyciągnąć następujący wniosek. Gryzeofulwina podawana w okresie ciąży samicom powoduje w łożysku zmniejszenie się aktywności fosfatazy zasadowej, niewielkie osłabienie reakcji na adenozyntroójfosfatazę, a nie zmienia odczynu na fosfatazę kwaśną i dehydrogenazę mleczanową.

PIŚMIENNICTWO

1. Canivec R.: Le placenta de rat et son activite endocrine. Archives d'Anatomie, d'Histologie et d'Embryologie. 1—9, Strasbourg 1956.
2. Christie G. A.: Histochemie 9, 93—116, 1967.
3. Christie G. A.: Histochemie 12, 189—207, 1968.
4. Christie G. A.: Histochemie 12, 208—221, 1968.
5. Götz H., Reichenberg M.: Der Hautarzt 23, 485—492, 1972.
6. Grillo T. A. J.: Histochemie 30, 13—23, 1972.
7. Jonek J., Skabała H., Klimkiewicz Z., Dzieciuchowicz L.: Endokr. Pol. 16, 301—312, 1965.
8. Kędzia H., Pisarski T.: Endokr. Pol. 22, 463—476, 1971.
9. Kleineder E., Śliwińska M.: Przegl. Derm. 52, 143—148, 1965.
10. Koide S. S., Mitsudo S. M.: Endocrinology 76, 403—407, 1965.
11. Mazur H., Piekacz W.: Farm. Pol. 4, 273—280, 1970.
12. Mellgren G. L., Eide A.: Histochemie 29, 305—314, 1972.
13. Padykula H.: Amer. J. Anat. 92, 118—124, 1958.
14. Roszkiewicz J., Zawistowski St., Zegarska Z.: Fol. Morph. 29, 259—269, 1970.
15. Rdzaneck I.: Przegl. Derm. 59, 437—444, 1962.





16. Rzeszowska G., Ciszewska-Popiołek B., Romanowska-Sarlej J.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska. Lublin, Sec. D. 29, 263—271, 1974.
17. Rzeszowska G., Romanowska-Sarlej J.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska. Lublin, Sec. D. 29, 107—116, 1974.
18. Szyzmar B.: Wiad. Lek. 15, 1163—1168, 1962.
19. Warszawa M.: Post. Hig. i Med. Dośw. 29, 497—513, 1975.

Otrzymano 31 III 1976.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Łožysko szczura z grupy kontrolnej. Intensywna reakcja na fosfatazę zasadową. Mikroskop Lumipan C. Zeiss Jena. Pow. ok. 300×.

Ryc. 2. Łožysko szczura z grupy doświadczalnej. Obniżenie reakcji na fosfatazę zasadową w porównaniu z grupą kontrolną. Mikroskop Lumipan C. Zeiss Jena. Pow. ok. 300×.

Ryc. 3. Łožysko szczura z grupy kontrolnej. Wyraźna reakcja na adenozynotrójfosfatazę. Mikroskop Lumipan C. Zeiss Jena. Pow. ok. 150×.

Ryc. 4. Łožysko szczura z grupy doświadczalnej. Niewielkie osłabienie reakcji na adenozynotrójfosfatazę w porównaniu z kontrolą. Mikroskop Lumipan C. Zeiss Jena. Pow. ok. 150×.

Ryc. 5. Łožysko szczura z grupy kontrolnej. Silna aktywność dehydrogenazy mleczanowej w nabłonku trofoblastycznym labiryntu. Mikroskop Lumipan C. Zeiss Jena. Pow. ok. 300×.

РЕЗЮМЕ

Исследовались плаценты самок белых крыс. Начиная с первого дня беременности, исследованные животные получали ежедневно вовнутрь гризеофульвин (Griseofulvin-forte „Medexport”) в дозе 2,5 мг, что составляет 16,6 мг/кг в.т. На 21 день беременности были взяты плаценты крыс контрольной и исследованной групп. В результате проведенных исследований установлено, что гризеофульвин вызвал понижение активности щелочной фосфатазы в плаценте, небольшое ослабление реакции на аденозинтрифосфатазу, но не изменил реакцию на кислую фосфатазу и молочнокислую дегидрогеназу.

SUMMARY

The research was carried out on female albino rat placentas. Griseofulwin (Griseofulvin-forte "Medexport") was orally administered to the experimental animals in daily doses of 2.5 mg which is 16.6 mg/kg c.c. from the 1st day of pregnancy. On the 21st day of pregnancy the placentas were collected from rats in the control and experimental group. In result of the carried out experiment it was ascertained that Griseofulvin causes a decrease in the alkaline phosphatase activity in the placenta and an unimportant weakening in the reaction to adenosinetriphosphatase but it did not change the reaction to acid phosphatase and lactic dehydrogenase.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. A rat placenta from the control group. An intensive reaction to alkaline phosphatase. Microscope Lumipan C. Zeiss Jena. Enlargement ca. 300×.

Fig. 2. A rat placenta from the experimental group. A decrease in the reaction to alkaline phosphatase in comparison to the control group. Microscope Lumipan C. Zeiss Jena. Enlargement ca. 300 \times .

Fig. 3. A rat placenta from the control group. A distinct reaction to adenosine-triphosphatase. Microscopoe Lumipan C. Zeiss Jena. Enlargement ca. 150 \times .

Fig. 4. A rat placenta from the experimental group. An unimportant weakening in the reaction to adenosinetriphosphatase in comparison to the control. Microscope Lumipan C. Zeiss Jena. Enlargement ca. 150 \times .

Fig. 5. A rat placenta from the control group. A strong lactic dehydrogenase activity in the trophoblastic labyrinth epithelium. Microscope Lumipan C. Zeiss Jena. Enlargement ca. 300 \times .