

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXV, 14

SECTIO D

1980

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

Irena KRÓLIKOWSKA-PRASAŁ,
Jadwiga ROMANOWSKA-SARLEJ

**Wpływ testosteronu na odczyn histochemiczne gonad kurcząt
w okresie embrionalnym**

Влияние тестостерона на гистохимические реакции гонад цыплят
в эмбриональный период

The Influence of Testosterone on Histochemical Reaction of Chicken Gonads
in Embryonic Period

Okres embrionalny charakteryzuje się dużą wrażliwością gruczołów płciowych na działanie hormonów sterydowych (7, 11, 12, 13). Wpływ ich dotyczy zarówno komórek somatycznych, jak i płciowych gruczołu. Działanie hormonu na komórke jest bardzo specyficzne i zależy od wielu czynników, między innymi od okresu, w którym hormon jest podawany i może w różny sposób wpływać na rozwój gonad (6). Wykazano, że testosteron wstrzyknięty zygocie samczej wywiera wpływ na rozwój gonady prowadząc jedynie do zmniejszenia wielkości jąder (*testis*). Natomiast u zygoty samiczej powoduje często degenerację gonady, a nawet przekształcenie jej w jądro (14). Pojawiły się prace dotyczące wpływu androgenów i estrogenów na rozwój płci zarodka (1, 2).

Badania podjęte przez nas mają na celu wykazanie zmian histochemicznych i morfologicznych w gonadach zarodków kurzych, otrzymujących testosteron w drugim lub siódmym dniu rozwoju.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Doświadczenie wykonano na 200 zarodkach kurzych rasy Brojler, otrzymanych z Wylęgarni Drobiu w Lublinie. Wyląg kurcząt przeprowadzano w termostacie w temp. 37—38°C przy odpowiedniej wilgotności powietrza. W drugiej i siódmej dobie inkubacji zarodkom podawano jednorazowo testosteron (*Testosteronum pro-*

pionatum, prod. Jeleniogórskich Zakładów Farmaceutycznych „Polfa”) metodą do-
żółtkową (8) w ilości 0,03 ml w stęż. 300 γ.

Grupę A stanowiły zarodki otrzymujące testosteron w drugim dniu rozwoju. Grupę B — zarodki otrzymujące hormon w siódmym dniu rozwoju. Grupa I kontrolna otrzymywała w takiej samej ilości rozpuszczalnik, tj. oliwę z oliwek, grupa II kontrolna stanowiła tzw. kontrolę „czystą” (nie podawano żadnej substancji).

W dniu wylęgu kurczęta dekapitowano i pobierano gonady: jądra lub jajniki. Na otrzymanym materiale, po uprzednim utrwaleniu w 10% formalinie lub płynie Bakera, przeprowadzano następujące reakcje histochemiczne: 1) reakcję na aktywność dehydrogenazy 3-β-hydroksysterydowej wg G a b e (4), 2) reakcję z sudanem III wg Daddiego, 3) reakcję PAS wg McManusa, 4) reakcję Bracheta, 5) barwienie hematoksyliną i eozyną oraz 6) barwienie histologiczne wg metody von Giesona.

WYNIKI BADAŃ

Ją d r a. W czasie przeprowadzania eksperymentu zwrócono uwagę, że odczyny na aktywność dehydrogenazy 3-β-hydroksysterydowej w jądrach zarodków kurcząt grupy kontrolnej były wysokie (ryc. 1), natomiast po podaniu testosteronu nastąpiło obniżenie aktywności enzymu, ale tylko u zarodków, które otrzymywały hormon w drugim dniu rozwoju (ryc. 2). Testosteron podawany w siódmym dniu rozwoju zarodka powodował minimalne zmiany w aktywności dehydrogenazy 3-β-hydroksysterydowej w jądrach w porównaniu z grupą kontrolną (ryc. 3).

Reakcja PAS na mukopolisacharydy wykazywała wzrost odczynu w jądrach zarodków otrzymujących testosteron, zarówno w drugim, jak i w siódmym dniu rozwoju w porównaniu z kontrolą (ryc. 4). Podobnie reakcja na kwasy nukleinowe wg Bracheta w jądrach zarodków kurcząt po podaniu hormonu była intensywniejsza niż w kontroli.

Tłuszcze barwione sudanem III w grupie kontrolnej „czystej” występowały w jądrach zarodków w postaci pomarańczowych kropeł w tkance łącznej między kanalikami jądra oraz w torebce narządu (ryc. 5). Kontrola „olejowa” wykazała, że u zarodków pod wpływem podania czystego oleju nastąpił wzrost substancji tłuszczowej w jądrze. Wzrastała zarówno ilość, jak i wielkość kropeł tłuszczów. Podawanie testosteronu w drugim i siódmym dniu rozwoju zarodka powodowało wzrost odczynu na tłuszcze w porównaniu z kontrolą „czystą”, natomiast minimalny wzrost reakcji w porównaniu z kontrolą „olejową” (ryc. 6).

Obrazy histochemiczne w jądrach po barwieniu hematoksyliną i eozyną oraz metodą von Giesona nie wykazywały istotnych różnic w obu grupach doświadczalnych.

J a j n i k i. W obrazach kontrolnych jajnika zarodków kurzych odczyn na dehydrogenazę 3-β-hydroksysterydową zlokalizowany był głównie w części rdzennej jajnika w postaci niebieskich ziaren formazanu. Natomiast

część korowa jajnika wykazywała słabszą reakcję (ryc. 7). Podawanie testosteronu w drugim dniu rozwoju zarodka powodowało niewielkie osłabienie reakcji enzymatycznej. W siódmym dniu rozwoju reakcja uległa dalszemu osłabieniu, a odczyń w postaci małych skupisk widoczne były tylko w rdzennej części jajnika (ryc. 8).

Ilość substancji tłuszczowych w jajnikach zarodków kurzych po podaniu testosteronu w drugim dniu rozwoju w porównaniu z kontrolą „czysta” nieznacznie wzrastała (ryc. 9), co było bardziej zauważalne w siódmym dniu podawania hormonu i to przede wszystkim w rdzennej części jajnika oraz w mniejszych ilościach w części korowej pod torebką narządu (ryc. 10).

Substancja PAS dodatnia w jajniku zarodków po podaniu hormonu była słabsza w porównaniu z kontrolą. Odczyn na RNA — również słaby. Barwienie hematoksyliną i eozyną oraz wg metody von Giesona wykazało, że przy iniekcji hormonu w siódmym dniu rozwoju nastąpiło zmniejszenie części korowej jajnika a poszerzenie części rdzennej (ryc. 11). Osłabiona była również eozynofilność komórek (ryc. 12).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badania prowadzone przez Łukinę (9, 11) wskazują, że hormony sterydowe podawane w okresie rozwojowym zarodka wywołują charakterystyczne przeobrażenie gonad. Stwierdzono (9), iż jednorazowa iniekcja benzoesanu estradiolu w czwartej dobie rozwoju powoduje feminizację lewych gonad męskich embrionów, natomiast w jedenastej dobie nie wpływa na tempo różnicowania się komórek płciowych. Stąd sądzi się, że okres wrażliwości gonad na działanie hormonów (10) jest ograniczony.

W naszych badaniach wybraliśmy dwa okresy rozwojowe gonad, w których podawaliśmy testosteron. Okres I — druga doba rozwoju zarodka kurczęcia, gdy następuje tworzenie się zawiązków gonad w postaci dwóch pasemek będących zgrubieniem listka zarodkowego. Okres II — siódma doba rozwoju, gdy obydwie zawiązki gruczołów płciowych jąder lub jajników są dobrze widoczne w postaci wałeczkowatych tworów (3, 15).

Badania nasze wskazują, że zasadnicze zmiany w gonadach męskich pod wpływem testosteronu występują w okresie I, tj. gdy hormon był podawany w drugim dniu rozwoju. Obserwowano wówczas osłabienie reakcji histochemicznej na aktywność dehydrogenazy 3- β -hydroksysterydowej. W tym okresie następował wzrost RNA i substancji PAS dodatniej. W okresie II, gdy hormon podawano w siódmym dniu rozwoju, wykazano minimalne obniżenie aktywności dehydrogenazy 3- β -hydroksysterydowej w gonadzie męskiej. Substancje tłuszczowe wykazywały niewielki wzrost,

natomiast obserwowano powiększenie całych gonad w porównaniu z kontrolą oraz zwiększenie mukopolisacharydów w tkance łącznej.

Hampe oraz Weniger i Zeis (cyt. wg 11) wskazują na większą wrażliwość męskich komórek płciowych na hormony płciowe żeńskie w okresie I rozwoju niż w późniejszym. Ponadto stwierdzono, że testosteron podawany w drugiej dobie rozwoju kurczenia prowadzi do spadku aktywności 3- β -hydroksysterydowej dehydrogenazy i tłuszczów w komórkach nadnerczy (5).

W gonadach żeńskich w okresie I, tj. w drugim dniu podawania testosteronu, obserwowano zmiany w aktywności dehydrogenazy 3- β -hydroksysterydowej, substancji PAS dodatniej i RNA. Obrazy morfologiczne nie wykazywały zasadniczych zmian w porównaniu z kontrolą. Dopiero w okresie II, tj. przy podawaniu hormonu w siódmym dniu rozwoju kurczenia, wykazano obniżenie odczynu enzymatycznego na dehydrogenazę 3- β -hydroksysterydową w części rdzennej gonady, która została znacznie powiększona. Wzrosła sudanofilność części rdzennej oraz torebki narządu. Nastąpiło nieznaczne osłabienie odczynu na mukopolisacharydy w tkance łącznej.

Wnioski

1. Działanie testosteronu na gonadę męską jest znacznie większe w okresie I jej rozwoju niż w okresie późniejszym.

2. Wpływ testosteronu na gonadę żeńską jest bardziej widoczny w okresie II, tj. w siódmej dobie rozwoju zarodka.

3. Należy sądzić, że testosteron wpływa na rozwój gonady żeńskiej wówczas, gdy nabiera ona cech charakterystycznych dla tego gruczołu, natomiast nie uwidacznia się w okresie I, gdy gonady (jądra i jajniki) wykazują małe różnice płciowe.

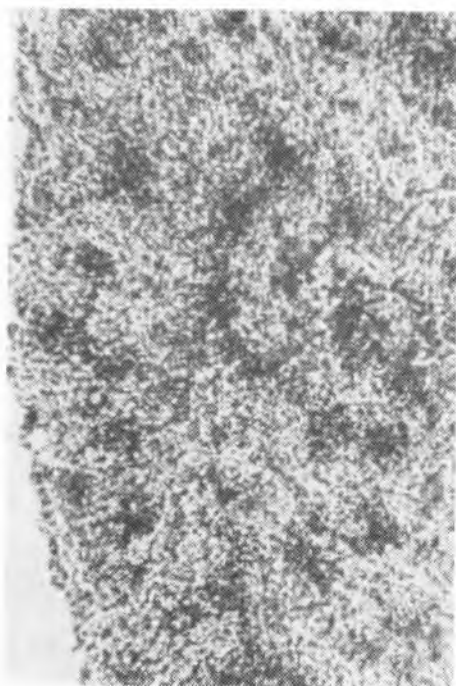
4. Okres wrażliwości na działanie hormonu uzależniony jest nie tylko od okresu podawania testosteronu i jego stężenia, lecz również od płci zarodka.

PIŚMIENNICTWO

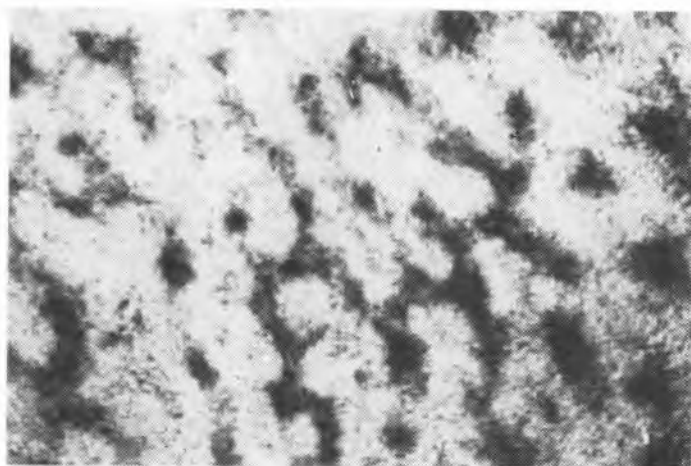
1. Benoit J.: *Traité de Zoologie*. Ed. P. P. Grasse Masson & Co, Paris 1950, 15, 419.
2. Burns R. K.: *Role of Hormones in the Differentiation of Sex in Sex and Internal Secretion*. Ed. W. C. Young Williams & Wilkins, Baltimore 1961, 2, 76.
3. Falin T. J.: *Arch. Anat. Gistol. Embr.* 54, 3—29, 1968.
4. Gabe M.: *Techniques histologiques* 659, 1968.
5. Jędrzejewska E. A.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sectio D* 34, 1979.



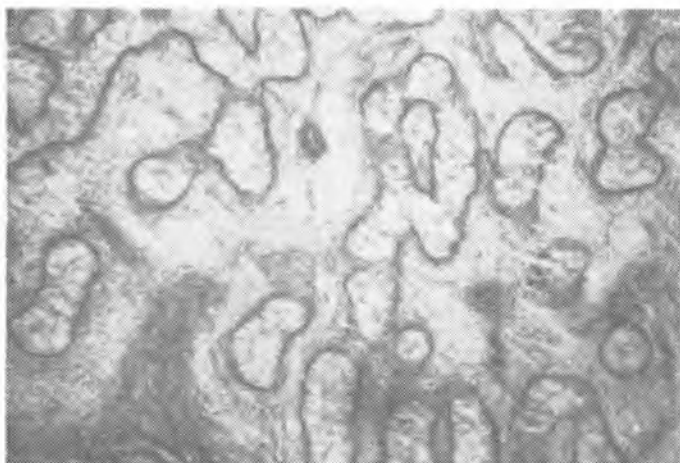
Ryc. 1



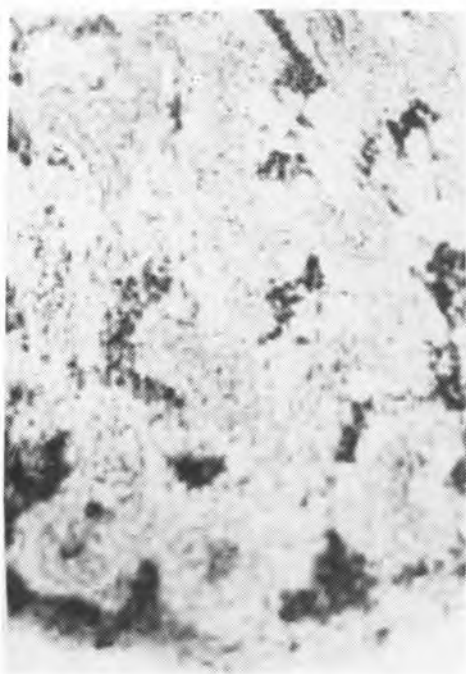
Ryc. 2



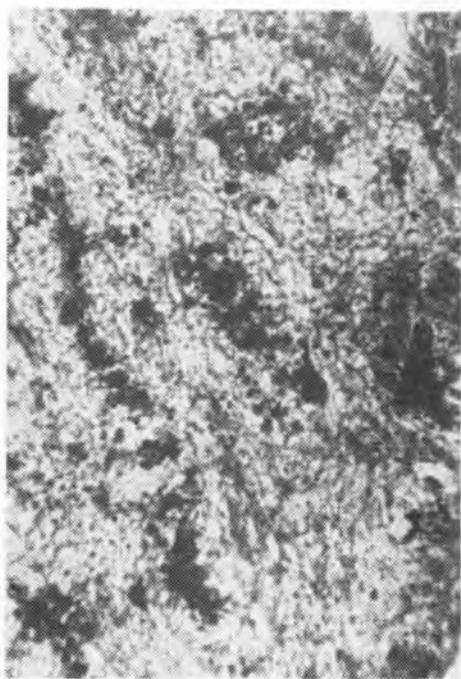
Ryc. 3



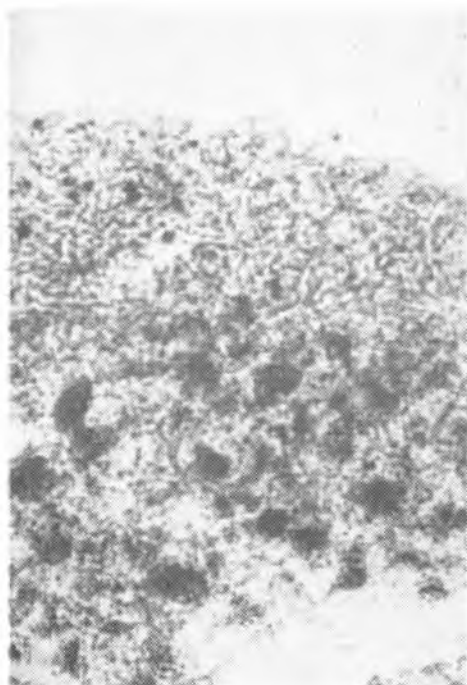
Ryc. 4



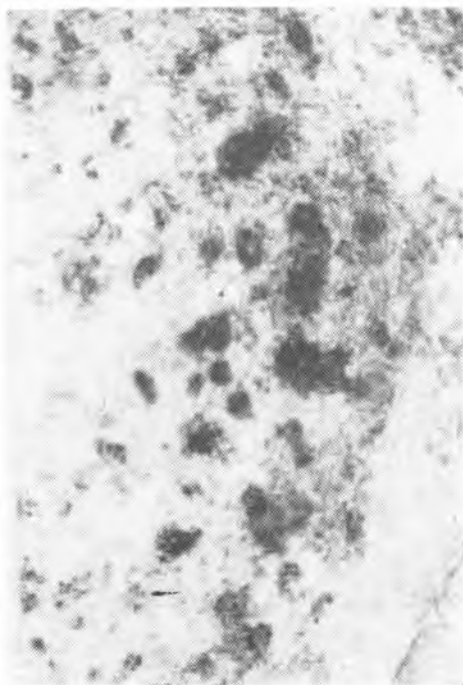
Ryc. 5



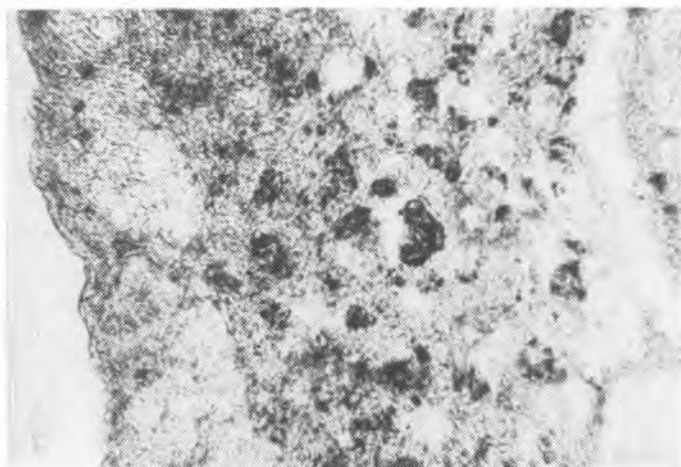
Ryc. 6



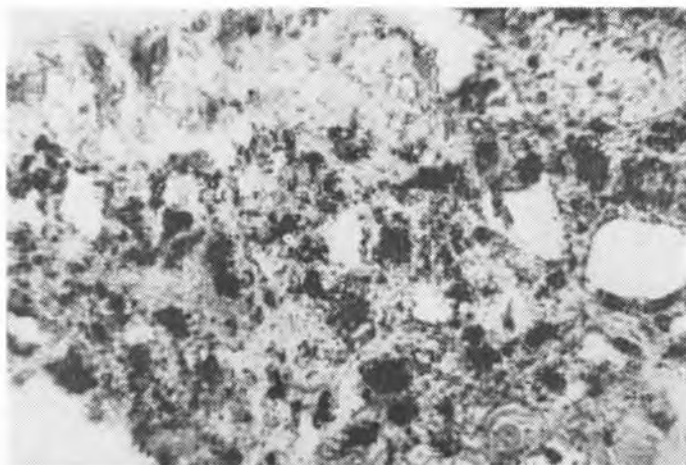
Ryc. 7



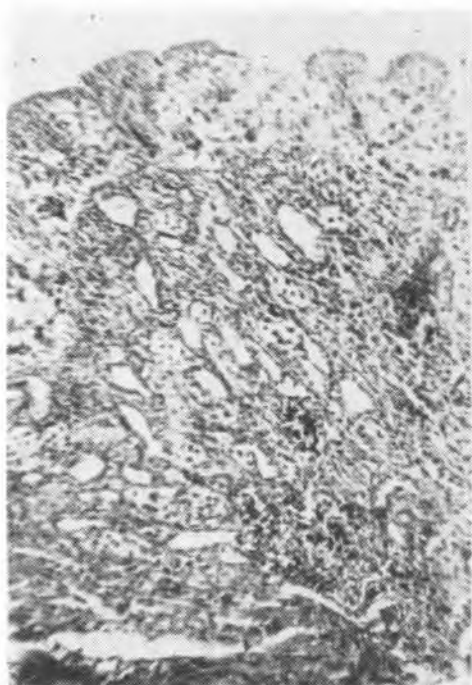
Ryc. 8



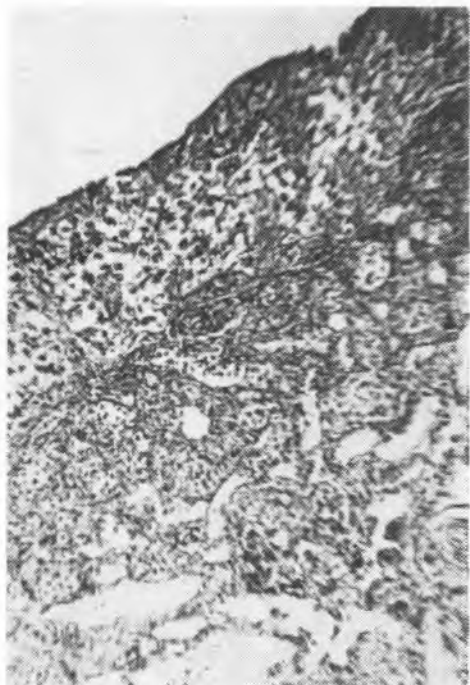
Ryc. 9



Ryc. 10



Ryc. 11



Ryc. 12

6. Kondo K.: J. Exp. Zool. 154, 329—332, 1963.
7. Kozaczenko J.: Ginek. Pol. 38, 5—9, 1966.
8. Larski Z.: Wirusologia weterynaryjna. PWRiL, Warszawa 1965, 382.
9. Łukina H. A.: Cytologija 16, 322—328, 1974.
10. Łukina H. A.: Cytologija 17, 902—908, 1975.
11. Łukina H. A.: Cytologija 20, 903—909, 1978.
12. Piotrowski J.: Przegl. Lek. 22, 547—549, 1966.
13. Piotrowski J.: Endokr. Pol. 21, 175—179, 1970.
14. Sturkie P. D.: Fizjologia ptaków. PWRiL, Warszawa 1970, 340.
15. Szmidt G. A.: O rozwoju zarodka. PWN, Warszawa 1955, 106.

Otrzymano 5 XI 1979.

OBJASNIENIA RYCIŃ

Ryc. 1. Reakcja na aktywność dehydrogenazy 3- β -hydroksysterydowej w gonadzie męskiej kurczęcia kontrolnego. Metoda wg Gabe. Pow. 300 \times .

Ryc. 2. Reakcja na aktywność dehydrogenazy 3- β -hydroksysterydowej w gonadzie męskiej kurczęcia otrzymującego testosteron w drugim dniu rozwoju. Metoda wg Gabe. Pow. 300 \times .

Ryc. 3. Aktywność 3- β -hydroksysterydowej dehydrogenazy w gonadzie męskiej kurczęcia otrzymującego testosteron w siódmym dniu rozwoju. Metoda wg Gabe. Pow. 300 \times .

Ryc. 4. Reakcja PAS na mukopolisacharydy w gonadzie męskiej kurcząt otrzymujących testosteron w drugim dniu rozwoju. Metoda McManusa. Pow. 300 \times .

Ryc. 5. Odczyn na tłuszcze w gonadzie męskiej kurcząt kontrolnych. Barwienie sudanem III. Pow. 300 \times .

Ryc. 6. Odczyn na tłuszcze w gonadzie męskiej kurcząt otrzymujących testosteron w siódmym dniu rozwoju. Barwienie sudanem III. Pow. 300 \times .

Ryc. 7. Reakcja na aktywność dehydrogenazy 3- β -hydroksysterydowej w gonadzie żeńskiej kurczęcia kontrolnego, Metoda wg Gabe. Pow. 300 \times .

Ryc. 8. Reakcja na aktywność dehydrogenazy 3- β -hydroksysterydowej w gonadzie żeńskiej kurczęcia otrzymującego testosteron w siódmym dniu rozwoju. Metoda wg Gabe. Pow. 300 \times .

Ryc. 9. Reakcja na tłuszcze w gonadzie żeńskiej kurczęcia otrzymującego testosteron w drugim dniu rozwoju. Barwienie sudanem III. Pow. 300 \times .

Ryc. 10. Odczyn na tłuszcze w gonadzie żeńskiej kurczęcia otrzymującego testosteron w siódmym dniu rozwoju. Barwienie sudanem III. Pow. 300 \times .

Ryc. 11. Jajnik kurczęcia kontrolnego. Metoda von Giesona. Pow. 200 \times .

Ryc. 12. Jajnik kurczęcia otrzymującego testosteron w siódmym dniu rozwoju. Metoda von Giesona. Pow. 200 \times .

РЕЗЮМЕ

Опыты велись на куриных эмбрионах, которые на другой или седьмой день эмбриональной жизни получали однократно тестостерон (концентрация — 300 γ). В день вылупливания цыплят брали мужскую или женскую гонаду и проводили гистохимические реакции на активность 3-d- β -стероидовой дегидрогеназы, а также реакции на жиры, мукополисахариды и RNA.

Результаты исследований показывают, что тестостерон имеет более значительное влияние на развитие мужской гонады, если его применим в первый период развития эмбриона т.е. на второй день. Влияние тестостерона на женскую гонаду был сильнее во время второго периода т.е. на седьмой день развития.

SUMMARY

Testosterone, at a concentration of 300 γ , was once given to chick embryos on the second and seventh days of their development. On the hatching day male and female gonads were collected and histochemical reactions for the activity of 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase, fats, mucopolisaccharides and RNA were performed. The findings indicate that testosterone had a greater influence on the development of the male gonad, when given in the first period of its development (the second day), while the effect of testosterone on the female gonad was higher in the second period, i.e. on the seventh day of its development.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Reaction to 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in a male gonad of a control chicken. According to the method of Gabe. 300 \times .

Fig. 2. Reaction to 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in a chicken male gonad after administration of testosterone on the second day of development. Method of Gabe. 300 \times .

Fig. 3. 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in a chicken male gonad after administration of testosterone on the seventh day of development. Method of Gabe. 300 \times .

Fig. 4. PAS reaction to mucopolysaccharides in a male gonad after administration of testosterone on the second day of development. Method of McManus. 300 \times .

Fig. 5. Reaction to fats in a male gonad of a control chicken. Sudan III staining. 300 \times .

Fig. 6. Reaction to fats in a male gonad after administration of testosterone on the seventh day of development. Sudan III staining. 300 \times .

Fig. 7. Reaction for 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in a female gonad of control chicken. Method of Gabe. 300 \times .

Fig. 8. Reaction to 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase activity of a chicken female gonad, after administration of testosterone on the seventh day of development. Method of Gabe. 300 \times .

Fig. 9. Reaction to fats in a chicken female gonad after administration of testosterone on the second day of development. Sudan III staining. 300 \times .

Fig. 10. Reaction to fats in a chicken female gonad after administration of testosterone on the seventh day of development. Sudan III staining. 300 \times .

Fig. 11. A control chicken ovary. Van Gieson's method. 200 \times .

Fig. 12. A chicken ovary after administration of testosterone on the seventh day of development. Van Gieson's method. 200 \times .