

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

Alicja ZARĘBSKA

Wpływ hydroksyzyny na śledzionę samic szczurów w okresie ciąży

Влияние гидроксизина на селезенку самок крыс в период беременности

The Influence of Hydroxyzine on the Spleen of Female Rats during Pregnancy

Hydroksyzyna (*hydroxyzine*, Hydroxizinum, Atarax) jest jednym z często stosowanych związków z grupy leków ataraktycznych. Pomimo niewątpliwych walorów terapeutycznych, działanie jej nie jest pozbawione skutków ubocznych (3), co ma szczególne znaczenie, gdy przyjmowana jest przez kobiety w ciąży. Biorąc to pod uwagę postanowiono przebadac wpływ hydroksyzyny na śledzionę szczurów ciężarnych.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Samice szczurów o c.c. 120—150 g zostały podzielone na 6 grup:

grupa I kontrolna (K_1) — 3 zwierzęta nieciążarne, nie otrzymywały leku;

grupa I doświadczalna (H_1n) — 3 zwierzęta nieciążarne, otrzymywały hydroksyzynę w dawce 5 mg/kg c.c.;

grupa II doświadczalna (H_2n) — 3 zwierzęta nieciążarne, otrzymywały hydroksyzynę w dawce 50 mg/kg c.c.;

grupa II kontrolna (K_2) — 3 zwierzęta ciężarne, nie otrzymywały leku;

grupa III doświadczalna (H_1c) — 3 zwierzęta ciężarne, otrzymywały hydroksyzynę w dawce 5 mg/kg c.c.;

grupa IV doświadczalna (H_2c) — 3 zwierzęta ciężarne, otrzymywały hydroksyzynę w dawce 50 mg/kg c.c.

Zwierzętom grup doświadczalnych podawano lek codziennie rano przed karmieniem w iniekcji dootrzewnowej przez 3 dni przed zapłodnieniem oraz w czasie całej ciąży. Zwierzęta grup kontrolnych otrzymywały odpowiednią objętość soli fizjologicznej. Szczurzyce grup doświadczalnych I i III przyjęły w sumie ok. 15 mg hydroksyzyny, a szczurzyce grup doświadczalnych II i IV — ok. 150 mg. Zwierzęta były dekapitowane 1—2 dni przed zakończeniem ciąży.

Skrawki śledziony utrwalano w formalinie do przeglądowego barwienia hematoxyliną i eozyną (H+E) oraz w płynie Carnoya — do wykrywania kwasów nukleinowych według metody Bracheta, a następnie zatapiano w parafinie. Do wykrywania aktywności fosfatazy kwaśnej (Fk) i fosfatazy zasadowej (Fz) zastosowano utrwalanie w płynie Bakera, a skrawki krojono na mikrotomie mrozeniowym.

Zdjęcia wykonano przy pomocy mikroskopu i aparatu fotograficznego Ergaval firmy Carl Zeiss — Jena.

WYNIKI BADAŃ

SAMICE NIECIĘZARNE

Grupa I kontrolna

Barwienie H+E uwidacznia strukturę typową dla śledziony, z silnie zasadochłonną obwodową częścią grudek chłonnych oraz mniej zasadochłonnym ośrodkiem ich rozmnażania i miazgą czerwoną. Stwierdzono różnice w wielkości jąder komórkowych oraz stopniu kondensacji chromatyny. Fz wykazuje słabą aktywność w miazdze czerwonej oraz umiarkowaną w błonie wewnętrznej tętniczek środkowych i większych naczyń. W samych grudkach odczyn jest ujemny. Dodatni odczyn na Fk stwierdzono w miazdze czerwonej w bardzo dużych, okrągłych i sporadycznie występujących komórkach o nieregularnym kształcie. Ostatnie z komórek widoczne są w liczbie kilku również w ośrodku rozmnażania grudek chłonnych. W strefie zagęszczenia w wielu grudkach chłonnych obserwowano mniejsze komórki z dodatnim odczynem na Fk. Metoda Bracheta na obecność kwasów nukleinowych wyraźnie różnicuje grudki chłonne na dwie części: a) ośrodek rozmnażania, w którym widoczne są większe w porównaniu ze strefą zagęszczenia komórki, zawierające w cytoplazmie umiarkowaną ilość RNA, oraz pojedyncze, bardzo duże komórki z dużym jądrem i cytoplazmą upakowaną ziarnami RNA; w jądrach tych komórek obserwowano duże, a niekiedy dwa silnie pyroninochłonne jąderka; b) strefę zagęszczenia, w której obecne małe komórki prawie nie zawierają RNA w cytoplazmie; jednakże sporadycznie występują tu bardzo duże komórki z dużą ilością RNA, takie jak w ośrodku rozmnażania. Na zewnątrz strefy zagęszczenia obserwowano limfocyty luźniej ułożone niż w tej strefie. W mikroskopie świetlnym obszar ten daje jasnoróżową obwódkę dookoła zielononiebieskiej strefy zagęszczenia, która z kolei otacza wyraźnie różowy ośrodek rozmnażania.

W miazdze czerwonej widoczne są komórki różnej wielkości i z różną ilością RNA, ułożone luźniej. Obserwowano bardzo duże komórki kilkujądrowe z pyroninochłonną, drobnoziarnistą cytoplazmą, ułożone poje-

dynczo, a także średniej wielkości, również z dużą ilością RNA, tworzące niekiedy skupienia, zwłaszcza w pobliżu ścian zatok.

Grupa I doświadczalna

Barwienie skrawków śledziony H+E jak również badanie na aktywność Fk nie wykazało żadnych zmian w porównaniu z kontrolą. Natomiast aktywność Fz była wzmożona. Obecność tej hydrolazy obserwowano nie tylko w tętniczkach i większych naczyniach, ale również w ścianach zatok — w błonach podstawnych oraz błonach komórkowych komórek wyścielających zatoki. Metoda Bracheta uwidoczniała większą ilość komórek z intensywnie czerwoną cytoplazmą na terenie grudek chłonnych i miazgi czerwonej. Obserwowano większą liczbę makrofagów, a wśród nich komórek bardzo dużych, kilkujądrowych z drobnymi ziarnami RNA.

Grupa II doświadczalna

Na preparatach barwionych H+E ilość grudek chłonnych w mięszu śledziony wydawała się być większa w porównaniu z kontrolą, a same grudki lepiej rozbudowane. Dotyczyło to zwłaszcza strefy zagęszczenia, która ponadto barwiła się silniej zasadochłonne niż w kontroli. W wielu miejscach pasy zagęszczenia sąsiednich grudek zlewały się ze sobą. Lokalizacja odczynu na Fz była taka jak w grupie I doświadczalnej. Jednakże błony niektórych komórek położonych w pobliżu naczyń zatokowych i w ich ścianach wykazywały bardzo silny odczyn. Fk natomiast wykazywała wyraźnie mniejszą aktywność w porównaniu z kontrolą. Obniżyła się ilość komórek z dodatnim odczynem w strefie zagęszczenia grudek chłonnych. Preparaty barwione metodą Bracheta pozwoliły stwierdzić większą ilość komórek zawierających RNA w porównaniu do kontroli, w tym znaczne zwiększenie liczby wielojądrowych makrofagów.

SAMICE CIĘŻARNE

Grupa II kontrolna

W porównaniu z grupą kontrolną zwierząt nieciążarnych wydaje się, że ilość grudek chłonnych w śledzionie była większa. Jednocześnie wiele grudek odznaczało się dużymi rozmiarami. Umiarkowany odczyn na Fz był

bardzo podobny jak w grupie I kontrolnej. Nie stwierdzono również ewidentnych różnic w aktywności Fk i ilości komórek z dużą zawartością RNA w cytoplazmie.

Grupa III doświadczalna

Ilość grudek chłonnych w śledzienie tej grupy zwierząt wydawała się być większa w stosunku do kontroli II. Aktywność Fz była umiarkowanie wzmożona, zwłaszcza w ścianach naczyń zatokowych oraz w błonach komórek przylegających do tych naczyń. Ziarnisty odczyn na Fk o typowym rozmieszczeniu był wyraźnie silniejszy. Również reakcja Bracheta wykazywała zwiększenie liczby aktywnych metabolicznie komórek — średniej wielkości na terenie miazgi czerwonej i bardzo dużych, wielojądrowych w mięszu całej śledziony.

Grupa IV doświadczalna

W śledzienie zwierząt tej grupy stwierdzono za pomocą barwienia H+E wyraźnie mniejszą ilość typowych grudek chłonnych w porównaniu z ciężarnymi samicami kontrolnymi. Niektóre grudki były małe i słabo widoczne, w wielu miejscach mięszu śledziony widoczne skupienia limfocytów nie tworzące typowych grudek. Obraz mikroskopowy sugerował pewną dezintegrację miazgi białej. Stwierdzono jednocześnie wyraźne osłabienie odczynu na Fz. W miazdze czerwonej aktywność tego enzymu była mała, lepiej dostrzegalna jedynie w niektórych komórkach w sąsiedztwie tętniczek środkowych. Odczyn na Fk był wzmożony w porównaniu z kontrolą, ale o wiele słabszy niż w grupie III doświadczalnej. Ilość komórek z dużą ilością RNA była wyraźnie większa niż w kontroli. Występowały one przede wszystkim w miazdze czerwonej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Śledziona jest ważnym narządem wchodzącym w skład układu odpornościowego organizmu. Różne populacje komórek, tworzące jej mięsz, mają swoje określone położenie, jak również funkcje w reakcji obronnej ustroju. Funkcje śledziony związane są z jej unaczynieniem. Ogólnie można powiedzieć, że poprzez filtrowanie przepływającej krwi ograniczają się z jednej strony do usuwania z ustroju drogą fagocytozy poprzez liczne makrofagi osiadłe i wędrujące ciał i związków szkodliwych, z dru-

giej — do zwalczania obcych antygenów poprzez dostarczanie różnych populacji komórek: limfocytów, makrofagów, komórek plazmatycznych (6). Wiele leków, oprócz zasadniczego działania terapeutycznego, wywiera hamujący wpływ na reakcje obronne ustroju (2). Sugestie te znane są również w odniesieniu do hydroksyzyny.

Przeładowe barwienie preparatów śledziony potwierdziło zróżnicowaną budowę jej mięszu z określonym rozmieszczeniem poszczególnych typów komórek. Wielkość jądra komórkowego oraz wygląd chromatyny pozwala rozróżnić makrofagi, limfocyty, limfoblasty i komórki plazmatyczne. Śledziona samic nieciążarnych grupy kontrolnej miała typową budowę — prawidłową ilość i wielkość grudek chłonnych zawierających wewnątrz wyraźne ośrodki odczynowe. Drobnutkie, dojrzałe limfocyty tworzyły dookoła ośrodka odczynowego pas zagęszczenia, czyli tzw. strefę B (5). Poza tą strefą obserwowano pas mniej zasadochłonny, tworzący już miążgę czerwoną, i miejsce, w którym limfocyty wydostają się z grudek chłonnych (4). W miążdze czerwonej obserwowano liczne naczynia zatokowe wypełnione krwinkami i liczne komórki jądrzaste. Zróżnicowanie mięszu jeszcze bardziej potwierdziła metoda Bracheta, za pomocą której można było uwidocznić stan metaboliczny cytoplazmy komórkowej. Komórki zaangażowane w produkcję ciał białkowych miały silnie rozbudowane w cytoplazmie szorstkie retikulum. Najsilniej pyroninochłonna cytoplazmę posiadały komórki plazmatyczne — średniej wielkości, bardzo często o kształcie zbliżonym do trójkąta z charakterystycznym sprychowatym jądrem. Ponadto duże ilości ziarenek RNA, lecz bardziej drobnych niż w komórkach plazmatycznych, zawierały duże komórki żerne. Występowały one prawie w każdym ośrodku odczynowym w liczbie kilku. Bardzo możliwe, że były to tzw. komórki dendrytyczne (9), odgrywające ważną rolę w przenoszeniu antygenów i współuczestniczące w formowaniu ośrodka odczynowego na dany antygen. Duże, wielojądrowe makrofagi z drobnutkimi ziarenkami RNA powstały prawdopodobnie ze zlania się kilku komórek żernych jednojądrowych (8). Aktywność Fz w miążdze czerwonej i ścianach tętniczek związana jest z aktywnym przenikaniem związków chemicznych między naczyniami krwionośnymi a mięszem śledziony. Aktywność Fk wiąże się natomiast z komórkami wyposażonymi w bogaty aparat lizosomalny. Komórkami tymi są fagocyty różnego rodzaju oraz dojrzałe limfocyty (8).

Zastosowanie dawki hydroksyzyny w wysokości 5 mg/kg c.c. u samic nieciążarnych nie spowodowało zmian w strukturze śledziony. Również nie stwierdzono zmian w aktywności Fk. Natomiast aktywność Fz była umiarkowanie wzmożona w ścianach naczyń oraz błonach niektórych komórek. Reakcja Bracheta uwidaczniała więcej komórek zawierających silnie rozbudowaną ER. Można przypuszczać, że te zmiany są wstępnym etapem

do dalszych zmian biochemicznych i morfologicznych w komórkach oraz, że mała dawka leku wywiera wpływ mobilizujący i aktywujący komórki.

Po 10-krotnie większej dawce leku (50 mg/kg c.c.) zmiany morfologiczne w mięszu stały się bardziej widoczne. Zwiększyła się ilość grudek chłonnych, a strefy dojrzewania były silniej upakowane limfocytami. Zwiększyła się też ilość komórek bogatych w RNA. Równocześnie Fk wykazywała mniejszą aktywność w stosunku do kontroli. Możliwe, że komórki z bogatym aparatem lizosomalnym z jednej strony wywędrują ze śledziony, z drugiej zużywają enzymy lizosomalne podczas fagocytozy.

Śledziona u kontrolnych samic ciężarnych wykazywała oznaki pobudzenia immunologicznego, objawiającego się w porównaniu z samicami nieciążnymi nieco zwiększoną aktywnością Fz i większą liczbą grudek chłonnych. Aktywność Fk była niższa, co może być równoznaczne ze zwiększonym odprowadzaniem limfocytów i fagocytów na obwód w przypadku „fizjologicznego raka” lub przeszczepu obcej tkanki, za jaki uważana jest ciąża.

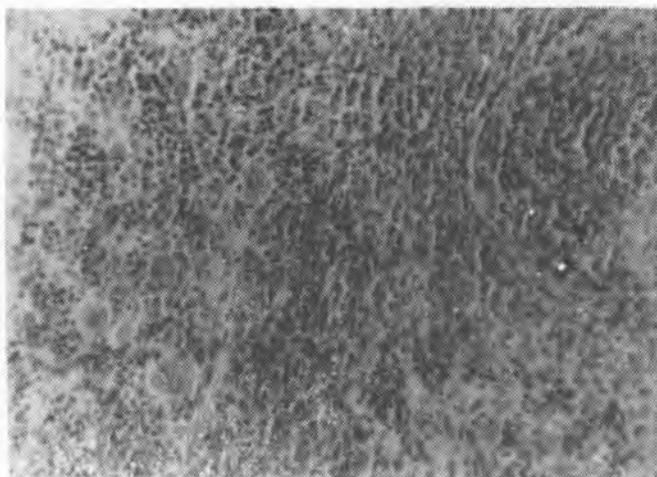
Zastosowana mała dawka hydroksyzyny (5 mg/kg c.c.) wywołała już wyraźne zmiany w postaci silnego wzmoczenia aktywności Fk i zwiększenia ilości komórek immunologicznie czynnych. Fakt ten wskazuje na większą wrażliwość śledziony podczas ciąży na podawany związek. Większą wrażliwość niektórych narządów chomika w okresie ciąży potwierdzają dane Halin i arza i Sikorskiego (1).

Większa 10-krotnie dawka hydroksyzyny, zastosowana u zwierząt ciężarnych, spowodowała zmiany, które można uważać już za niekorzystne. Podczas gdy u zwierząt nieciążnych ta sama dawka leku wpłynęła na mobilizację narządu i produkcję większej liczby komórek immunologicznie czynnych, u samic ciężarnych stwierdzono zmniejszenie liczby grudek chłonnych, brak w niektórych ośrodków odczynowych i pewne zmiany dezintegracyjne w mięszu. Należy sądzić, że zmiany te są równoznaczne z przejściowym zmniejszeniem zdolności obronnej narządu.

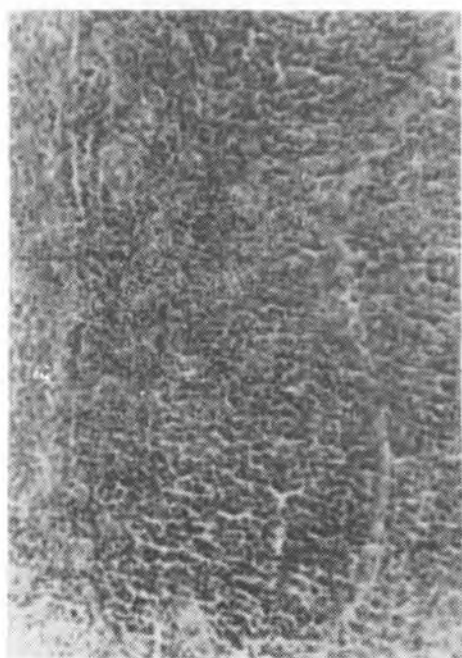
Trudno powiedzieć, w jaki sposób stwierdzone zmiany w mięszu śledziony są bezpośrednim wpływem działania leku. Bardziej prawdopodobny wydaje się wpływ pośredni — poprzez modulację aktywności układu nerwowego i wydzielania hormonów hipertensyjnych. Stwierdzono, że pod wpływem działania adrenaliny zwiększa się w nadnerczu i śledzionie wydzielanie prostaglandyn, których miejscowy wpływ może być bardzo różny (2).

Wnioski

1. Śledziona szczurów ciężarnych jest bardziej wrażliwa na hydroksyzynę niż szczurów nieciążnych.



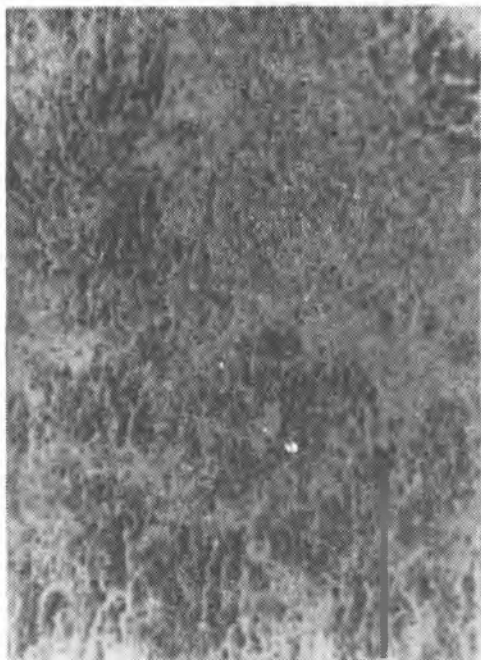
Ryc. 1



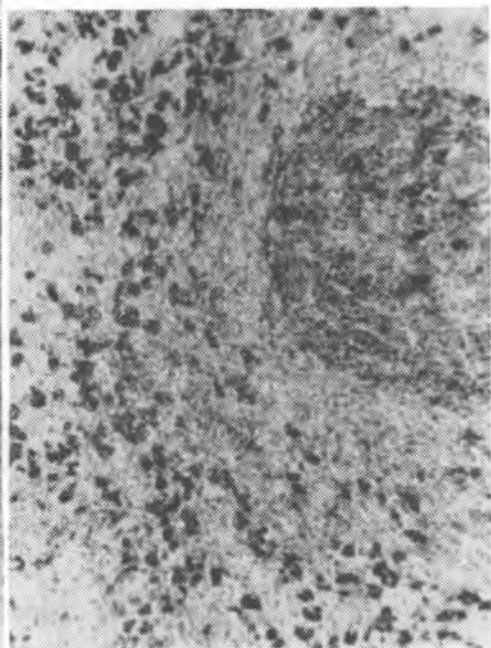
Ryc. 2



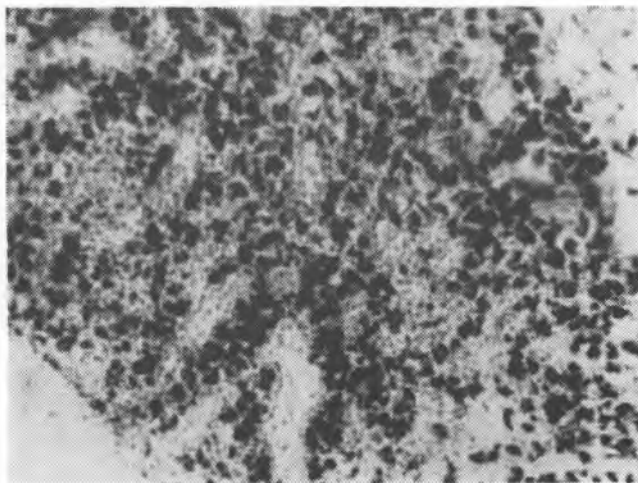
Ryc. 3



Ryc. 4



Ryc. 5



Ryc. 6

2. Hydroksyzyna w dawce 5 mg/kg c.c. jest dobrze tolerowana przez szczury ciężarne.

3. Hydroksyzyna w dawce 50 mg/kg c.c. wywołuje zmiany, które można uważać za równoznaczne z przejściowym osłabieniem aktywności metabolicznej i zdolności obronnej narządu.

PIŚMIENNICTWO

1. Haliniarz W., Sikorski R.: Study of the Embryotoxicity of the Preparation Biseptol — Polfa in Pregnant Hamsters. *Gin. Pol.* **50** (6), 481, 1979.
2. Horst A.: Molekularne podstawy patogenezy chorób. PZWL, Warszawa 1979.
3. Kubikowski P., Kostowski W.: Farmakologia. Postawy farmakoterapii. PZWL, Warszawa 1979.
4. Nieuwenhuis P., Ford W. L.: Comparative Migration of B- and T-lymphocytes in the Rat Spleen and Lymph Nodes. *Cellular Immunology* **23**, 254, 1976.
5. Olah I. i wsp.: Ultrastructure of Lymphoid Organs. An Electron-microscopic Atlas. *Académiai Kiadó*, Budapest 1975.
6. Płytycz B.: Spojrzenie z perspektywy ewolucji na limfocyty jako komórki immunologicznie kompetentne. *Kosmos A* **29**, 169, 1980.
7. Płytycz B.: Filogeneza układu odpornościowego kregowców. *Post. Biol. Kom.* **7** (4), 233, 1980.
8. Rzućciło L.: Immunologia ogólna i doświadczalna. PWN, Warszawa 1981.
9. White R. G. i wsp.: Localization of a Protein Antigen in the Chicken Spleen. Effect of Various Manipulative Procedures on the Morphogenesis of the Germinal Centre. *Immunology* **28**, 1, 1975.

Otrzymano 1 X 1982.

OBJAŚNIENIA RYCIŃ

Ryc. 1. Śledziona szczura z grupy I kontrolnej. W miazdze czerwonej obecne olbrzymie, wielojądrowe makrofagi. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Pow. ok. 200X.

Ryc. 2. Śledziona szczura z grupy II doświadczalnej. Zwiększenie ilości grudek chłonnych. Grudki zlewają się ze sobą. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Pow. ok. 200X.

Ryc. 3. Śledziona szczura z grupy IV doświadczalnej. Zmniejszenie ilości grudek chłonnych. Obecność grudek małych, nietypowych. Liczne skupienia limfocytów w miazdze czerwonej, nie tworzące grudek. Barwienie hematoksyliną i eozyną. Pow. ok. 200X.

Ryc. 4. Śledziona szczura z grupy IV doświadczalnej. W miazdze czerwonej dużo komórek z cytoplazmą bogatą w RNA. Barwienie według metody Bracheta. Pow. ok. 200X.

Ryc. 5. Śledziona szczura z grupy II kontrolnej. Odczyn na fosfatazę kwaśną według metody Gomoriego. Pow. ok. 200X.

Ryc. 6. Śledziona szczura z grupy III doświadczalnej. Zwiększenie aktywności fosfatazy kwaśnej. Metoda Gomoriego. Pow. ok. 200X.

Р Е З Ю М Е

Беременные самки белых крыс получали уколы гидроксизина в дозе 5 мг/кг в.т. и 50 мг/кг в.т. ежедневно в течение 3 дней до беременности и во время беременности. Этот препарат получали одновременно небеременные самки. На основе полученных результатов сделано следующие выводы: а) селезенка беременных крыс более чувствительна к гидроксизину, чем селезенка небеременных крыс; б) дозу гидроксизина 5 мг/кг в.т. беременные крысы хорошо сносили; в) доза 50 мг/кг в.т. вызывала изменения, которые отвечают переходному понижению метаболической активности этого органа.

S U M M A R Y

Pregnant white rat females were treated with hydroxyzine i.p. in a dose of 5 mg/kg and 50 mg/kg of body weight every day for 3 days before pregnancy and during pregnancy. The drug was parallelly administered to non-pregnant females. On the basis of the obtained results, the following conclusions were drawn: a) the spleen of pregnant rats is more sensitive to hydroxyzine than the spleen of non-pregnant rats; b) a dose of hydroxyzine of 5 mg/kg of body weight was well tolerated by pregnant rats; c) a dose of hydroxyzine of 50 mg/kg of body weight caused the changes which may be considered tantamount with a temporary attenuation of this organ's metabolic activity.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. The spleen of a control rat, group I. In the red pulp there are large multinuclei macrofages. Colouring with hematoxylin and eosin. Magn. ca 200X.

Fig. 2. The spleen of an experimental rat, group II. An increase in the quantity of lymphatic papules. The lymphatic papules are connected together. Colouring with hematoxylin and eosin. Magn. ca 200X.

Fig. 3. The spleen of an experimental rat, group IV. A decrease of the lymphatic papule quantity. The lymphatic papules are small, non-typical. Colouring with hematoxylin and eosin. Magn. ca 200X.

Fig. 4. The spleen of an experimental rat, group IV. In the red pulp there are numerous cells with cytoplasm rich in RNA. Reaction according to Brachet's method. Magn. ca 400X.

Fig. 5. The spleen of a control rat, group II. Reaction to acid phosphatase according to Gomori's method. Magn. ca 200X.

Fig. 6. The spleen of an experimental rat, group III. An increase of acid phosphatase activity. Reaction according to Gomori's method. Magn. ca 200X.