

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXXIII, 48

SECTIO D

1978

Zakład Histologii i Embriologii. Pracownia Cytologii Doświadczalnej.
Instytut Biologiczno-Morfologiczny. Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr med. dr h.c. Stanisław Grzycki

Elżbieta Anna JĘDRZEJEWSKA,
Jadwiga ROMANOWSKA-SARLEJ

**Wpływ jednorazowej dawki estradiolu na wylęg kurcząt
i obraz histotopochemiczny ich nadnerczy**

Влияние разовых доз эстрадиола на инкубацию цыплят и гистотопохимическую картину их надпочечников

The Effect of a Single Oestradiolum Dose on the Incubation of Chickens and Histotopochemical Picture of their Suprarenal Glands

Zachowanie się kory nadnerczy zwierząt pod wpływem estrogenów obserwowane było przez wielu autorów, przy czym większość z nich uważa, że jednorazowa iniekcja powoduje powiększenie (12, 13, 3, 15, 2), a wielokrotna działa toksycznie (7, 8). L u p u l e s c o u (17) poprzez długotrwałe podawanie estrogenów wywołał u świnki morskiej i szczura przerost nowotworowy. Ciekawe obserwacje przeprowadził Z i e l e n i e w s k i (22, 23) w odniesieniu do powstawania nowotworów i szybkiego narastania objawów zespołu Cushinga po zająci w ciąży.

W okresie ciąży następuje znaczne podniesienie się poziomu estrogenów (9). Estrogeny te są metabolizowane przy udziale kory nadnerczy i wątroby płodu (14, 5). W zarodku następuje przemiana estradiolu przez hydroksylację i sulfurylację do estriolu, który jest wydalany z organizmu (9). W przypadku niedoboru dehydrogenaz dochodzi do nieprawidłowego metabolizowania estradiolu w estriol. Zbyt niski poziom estriolu prowadzi do obumierania zarodka (9, 4), natomiast nadmiar estradiolu może prowadzić do rozrostu nowotworowego.

Naszym celem było sprawdzenie, w jakim stopniu jednorazowa dawka estradiolu wprowadzana przed wykształceniem lub po wykształceniu nadnerczy w zarodku wpływa na wylęg kurcząt i na obraz ich nadnerczy

w dniu wylęgu. Modelem naszych badań był zarodek kurczęcia: 1) w drugiej dobie rozwoju, nie posiadający wykształconych nadnerczy, 2) w siódmej dobie, kiedy nadnercza są już wykształcone, a zatem zarodek zaopatrzone jest w hormonalne mechanizmy regulacyjne (19, 20).

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono na 400 zarodkach kurzych rasy „Brojler” (Zakład Wylęgu Drobiu w Lublinie), które inkubowano w temp. 37°C, zachowując równocześnie odpowiednią wilgotność powietrza. Zarodkom podawano *Oestradiolum benzoicum* produkcji Jeleniogórskich Zakładów Farmaceutycznych w postaci roztworu olejowego metodą dożótkową (14). Zarodki badano w trzech grupach: grupę I stanowiły zarodki kontrolne, grupy II i III — zarodki doświadczalne.

W grupie I przeprowadzono:

1) kontrolę „czystą” obejmującą 50 zarodków kurzych, którym nie podawano żadnych substancji, a inkubację przeprowadzono celem oceny warunków wylęgu i jakości jaj;

2) kontrolę „olejową” — na 50 zarodkach kurzych, którym wprowadzano dożótkowo 0,03 ml *oleum olivarum* w drugiej dobie inkubacji;

3) kontrolę, w której zarodkom wprowadzano dożótkowo 0,03 ml *oleum olivarum* w siódmej dobie inkubacji.

Grupa II doświadczalna obejmowała 150 zarodków kurzych, którym wprowadzano *Oestradiolum benzoicum* w drugiej dobie inkubacji w dawce 150 γ w 0,03 ml rozpuszczalnika.

Grupa III doświadczalna obejmowała 100 zarodków kurzych, którym wprowadzano w siódmej dobie inkubacji *Oestradiolum benzoicum* w dawce 150 γ w 0,03 ml rozpuszczalnika, jakim był *oleum olivarum*. Po 21 dobach inkubacji, czyli w dniu wylęgu, kurczęta wszystkich grup dekapitowano i pobierano nadnercza.

Materiał przeznaczony do badań na skrawkach parafinowych grubości ok. 7 μ utrwalano w 10% formalinie przez 48 godz., natomiast do wykrywania lipidów i oznaczania aktywności dehydrogenazy 3- β -ol-hydroksysterydowej utrwalano w płynie Bakera w temp. +4°C przez 5 min., a skrawki grubości ok. 12 μ sporządzano na mikrotomie mroziowym.

W każdej z badanych grup wykonano preparaty przeglądowe, barwione hematoksyliną Mayera oraz 0,5% wodnym roztworem eozyny (1), a także zastosowano metodę van Giesona (1). Wielocukry oznaczano wg metody McManusa w celu określenia, czy ilość substancji PAS dodatnich jest charakterystyczna dla nadnerczy w dniu wylęgu, czy nie ma przerostu tkanki łącznej i substancji PAS dodatnich w komórkach. Lipidy wybarwiano sudanem III wg metody Daddiego w celu ustalenia ich ilości i rozmieszczenia (1). Aktywność dehydrogenazy 3- β -ol-hydroksysterydowej jako specyficznej dla nadnerczy i biorącej udział w metabolizowaniu estradiolu oznaczano wg metody, którą podaje G a b e (10).

W badaniach zwrócono uwagę na liczbę kurcząt, które wylęły się w grupach kontrolnych i doświadczalnych.

Grupa I — zarodki kontrolne. W kontroli „czystej” z 50 zarodków wykluło się 25 kurcząt, co stanowi 50% wylęgu. W kontroli, w której zarodkom podawano *oleum olivarum* w drugiej dobie rozwoju, z 50 zarodków wykluły się 23 kurczęta, co

stanowi 46%. W kontroli, w której zarodkom podawano *oleum olivarum* w siódmej dobie rozwoju, na 50 zarodków wykuło się 20 kurcząt, co stanowi 40% wylęgu.

Grupa II doświadczalna — obejmująca 150 zarodków, ze 112 zarodków zapłodnionych wykuło się 8, co stanowi 7,1% wylęgu.

Grupa III doświadczalna, obejmująca 100 zarodków, z 72 zarodków zapłodnionych wylęło się 16 kurcząt, co stanowi 22,2% wylęgu.

OBSERWACJE HISTOTOPOCHEMICZNE

Grupy kontrolne

Zarówno kontrola „czysta”, jak i kontrole „olejowe” były podobne. Barwienie metodami przeglądowymi, tzn. hematoksyliną i eozyną, oraz metodą van Giesona wykazało obraz typowej budowy nadnerczy ptaków. Występowały zarówno pasma, jak i gniazda komórek o różnym stopniu barwliwości cytoplazmy. Komórki śródnadnerczowe odróżniały się jaśniejszą cytoplazmą od komórek chromafinowych. Reakcja PAS wykazała słaby odczyn łącznotkankowej torebki narządu oraz wnikających w głąb gruczołu włókienek. Odczyn PAS dodatni wykazywały również ściany naczyń krwionośnych. W obu typach komórek odczyn na wielocukry był śladowy. Wybarwienie tłuszczu sudanem III wyodrębniło skupiska komórek śródnadnerczowych, obciążonych lipidami, od komórek chromafinowych, w których brak było reakcji barwnej (ryc. 1). Duża aktywność dehydrogenazy 3- β -ol-hydroksysterydowej we wszystkich kontrolach występowała tylko w komórkach śródnadnerczowych, bardzo wyraźnie wyodrębniając je od komórek chromafinowych, w których obecności tego enzymu nie wykrywano (ryc. 3).

Grupa II doświadczalna

Oestradiolum benzoicum podawano w tej grupie w drugiej dobie rozwoju. Przeprowadzono dokładną analizę nadnerczy, jednak barwienie H+E i metodą van Giesona nie wykazało różnic z kontrolnymi. Zaobserwowaliśmy taki sam układ w postaci pasm i kłębów komórek śródnadnerczowych i otaczających te skupiska komórek chromafinowych. Barwliwość cytoplazmy nie odróżniała ich od kontroli. Reakcja PAS wykazywała dodatni odczyn w torebce narządu i włóknach łącznotkankowych. Nie zaobserwowano wynaczynień w narządzie. Ilość substancji sudanofilnych w komórkach przypominała kontrolę i obserwowano je tylko w tkance śródnadnerczowej. Podobnie aktywność dehydrogenazy 3- β -ol-hydroksysterydowej uwidaczniała kłęby komórek śródnadnerczowych i nie obserwowano różnic w jej aktywności w porównaniu z kontrolą.

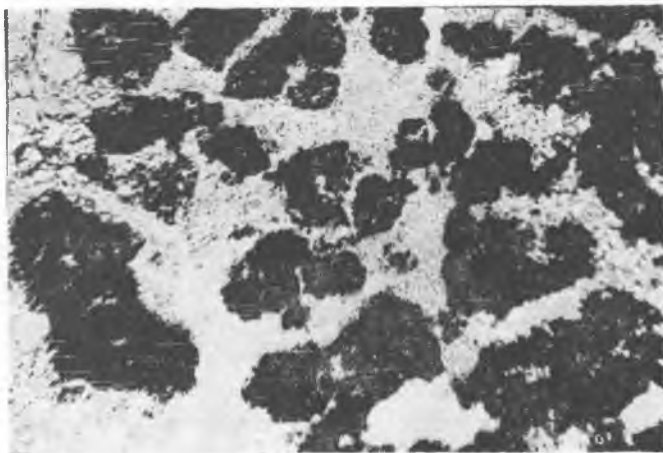
Grupa III doświadczalna

Oestradiolum benzoicum podawano w siódmej dobie rozwoju. Barwienie hematoksyliną i eozyną wykazało identyczny z kontrolą układ komórek w postaci kłębow i pasm. Komórki śródnadnerczowe nie wykazywały zaniku i nie obserwowano przerostu nowotworowego. Barwliwość cytoplazmy nie różniła się od kontroli. Zmian morfologicznych nie zauważono, ale obraz nadnerczy pozwalał stwierdzić lekki rozrost tkanki chromafinowej. Barwienie metodą van Giesona nie odbiegało od kontroli. Nie zaobserwowaliśmy krwawych wybroczyn. Reakcja PAS nieco silniej zaznaczyła się w tej grupie doświadczalnej. Występowała zarówno w torebce narządu, jak i włókienkach wnikaających w głąb narządu. Najistotniejsze różnice uwidoczniło barwienie sudanem III. Sudanofilność nadnerczy tej grupy doświadczalnej okazała się znacznie niższa niż w kontroli. Komórki śródnadnerczowe w mniejszym stopniu wypełniał tłuszcz (ryc. 2). Istotna również, jak się wydaje, była mała aktywność dehydrogenazy 3- β -ol-hydroksysterydowej. W komórkach śródnadnerczowych aktywność enzymu obrazowała nikła reakcja barwna, natomiast komórki chromafinowe pozostawały nadal bez odczynu. Można było zaobserwować większą ilość komórek bez reakcji barwnej (ryc. 4).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

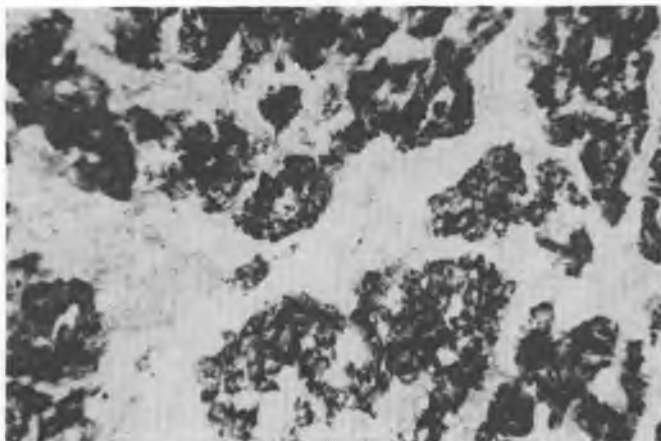
Liczne prace poświęcone wpływowi estradiolu na nadnercza zwierząt dorosłych w różnych warunkach doświadczalnych nie wyjaśniają jego wpływu na nadnercza w okresie rozwoju, bowiem organizm zarodka jest nastawiony na intensywną przemianę estradiolu w estriol, a poziom dehydrogenazy 3- β -ol-hydroksysterydowej jest bardzo wysoki i spada w pierwszym dniu po urodzeniu (11, 14, 21, 19).

W badaniach naszych estradiol wprowadzaliśmy kurczętom jednorazowo w dwóch okresach rozwoju, w okresie poprzedzającym wykształcenie nadnerczy i w okresie, kiedy nadnercza są ukształtowane. Zaobserwowaliśmy, że w pierwszym okresie podawania estradiol działał toksycznie na zarodek, a śmiertelność wynosiła 92,9%. Można przypuszczać, zgodnie z literaturą (9, 14, 21), że z powodu braku w tym okresie zdolności organizmu do regulacji hormonalnej estradiol nie mógł być metabolizowany w estriol, który jest konieczny do utrzymania przy życiu zarodka. Sama dawka nie wpływała toksycznie na zarodek, bowiem przy podawaniu w siódmej dobie rozwoju estradiol nie wywoływał tak dużej śmiertelności zarodka. Można przypuszczać, że ilość dehydrogenazy, koniecznej do metabolizowania estradiolu, a występującej w nadnerczach i wątrobie



Ryc. 1. Nadnercze kontrolne. Barwienie sudanem III. Intensywny odczyn na tłuszcze w komórkach śródnadnerczowych, brak reakcji w komórkach chromafinowych. Pow. ok. 80×

Control suprarenal gland. Colouring with Sudane III. Intensive reaction to fats in mesosuprarenal cells, no reaction in chromaphine cells. Magn. ca 80×



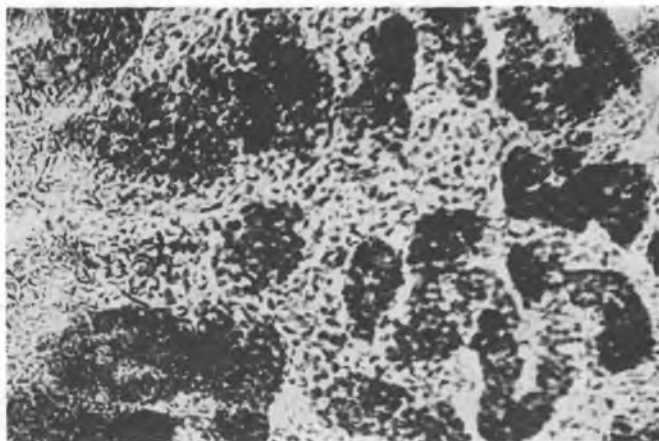
Ryc. 2. Nadnercze III grupy doświadczalnej. Barwienie sudanem III. Spadek sudanofilności w komórkach śródnadnerczowych. Widoczna większa ilość komórek pozbawionych reakcji barwnej. Pow. ok. 80×

Experimental suprarenal gland — group III. Colouring with Sudane III. Decrease of sudanophilia in mesosuprarenal cells. Greater number of cells with no colour reaction can be seen. Magn. ca 80×



Ryc. 3. Nadnercze kontrolne. Reakcja na dehydrogenazę 3- β -ol-hydroksysterydową w komórkach śródnađnerczowych, brak odczynów w komórkach chromafinowych.
Pow. ok. 80 \times

Control suprarenal gland. Reaction to dehydrogenase 3- β -ol-hydroksysteroid in mesosuprarenal cells, no reactions in chromaphine cells. Magn. ca 80 \times



Ryc. 4. Nadnercze III grupy doświadczałnej. Słaba aktywność dehydrogenazy 3- β -ol-hydroksysterydowej w komórkach śródnađnerczowych, widoczna mniejsza ilość komórek z odczynem. Pow. ok. 80 \times

Suprarenal gland of III experimental group. Feeble activity of dehydrogenase 3- β -ol-hydroksysteroid in mesosuprarenal cells, smaller number of cells with reaction can be seen. Magn. ca 80 \times

plodowej, była zbyt niska lub było jej całkowicie brak z powodu niewykształconych nadnerczy. Procent śmiertelności zarodków z wykształconymi nadnerczami był niższy, wynosił 77,8%, a w przypadku kontroli 60%. W nadnerczach kurcząt, którym podawano estradiol drugiego dnia, a które wylęły się, nie zauważono różnic w obrazie histologicznym i histochemicznym w porównaniu z kontrolą. Możliwe, że przeżycie 7,2% kurcząt wynikało ewentualnie z niedokładnego wprowadzenia estradiolu do żółtka. Dlatego nadnerczy kurcząt, które przeżyły nie braliśmy pod uwagę w tej pracy przy określaniu stopnia wpływu estradiolu na obraz histologiczny i histochemiczny nadnerczy. W przypadku kurcząt, którym wprowadzano estradiol siódmego dnia, można stwierdzić, że jednorazowe wprowadzenie estradiolu nie powodowało dużych zmian morfologicznych, podobnie jak w badaniach Malendowicza i Charta (18, 6). Zaobserwowaliśmy jednak jakby mały rozrost tkanki chromafinowej, bez różnicy wielkości jądra i barwliwości cytoplazmy. Zgodni co do tego są Japa i wsp. (12). Anderson (1934), Jones (1950) i Bergstrand (1952) (2) stwierdzili spadek materiału sudanofilnego po estradiolu u zwierząt dorosłych, w naszym doświadczeniu nadnercza również zawierały mniejszą ilość materiału sudanofilnego. Obserwowaliśmy nie tylko mniejszą ilość tłuszczu w komórkach śródnadnerczowych, ale i mniejszą ich ilość. Aktywność dehydrogenazy 3- β -ol-hydroksysterydowej była również słaba. Nadnercza kontrolne wykazywały wyższą jej aktywność. Wyjaśnieniem tego może być interesujące spostrzeżenie Goldmana, że nieprawidłowości rozwojowe obserwowane w płodowych gonadach i nadnerczach po przeciążeniu kotnych szczurzyce estradiolem występowały na skutek hamowania 3- β -ol-hydroksysterydo-dehydrogenazy (11). Spadek ilości materiału sudanofilnego i słaba aktywność dehydrogenazy świadczą o zaburzeniach metabolicznych w nadnerczach kurcząt obciążonych w okresie rozwoju estradiolem.

Wnioski

1. Nie zaobserwowano istotnych zmian morfologicznych, zwyrodnień nadnerczy, wybroczyn krwawych, po jednorazowym podaniu *Oestradiolum benzoicum*.
2. Estradiol podany przed wykształceniem nadnerczy działa toksycznie na wylęg zarodka i prowadzi do śmiertelnego zejścia.
3. Estradiol podany w siódmym dniu rozwoju przyczynia się w dużym procencie do obumierania zarodka, zmniejszenia się ilości komórek śródnadnerczowych, obniżenia sudanofilności, aktywności dehydrogenazy 3- β -ol-hydroksysterydowej w komórkach śródnadnerczowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Bagiński S.: Technika mikroskopowa. PWN, Warszawa 1965, 127, 202, 339.
2. Bergstrand C. G.: Acta Endocrinol. Supp. 8, 1—60, 1952.
3. Beru H. A.: Acta Endocrinol. 31, 349—350, 1958.
4. Bręborowicz H., Baraniecka K., Biniszkievicz W., Bręborowicz A.: Endokrynol. Pol. 20, 109—115, 1969.
5. Bręborowicz H., Krzywińska F., Pisarski T.: Endokrynol. Pol. 14, 329—334, 1963.
6. Chart I. I., Howie N., Krauser F.: Federation Proceedings 20, 117—177, 1961.
7. Danner M.: Klin. Wschr. 138, 658—662, 1938.
8. Danner M.: Arch. Entw. Mechan. 140, 345—351, 1940.
9. Górnicki B., Pawlikowski T.: Endokrynologia kliniczna wieku rozwojowego. PZWL, Warszawa 1974, 135—195, 20—32.
10. Gabe M.: Techniques histologiques. Masson et Cie. Paris 1968, 800—810.
11. Goldman A. S.: J. Clin. Endocrinol. Metab. 28, 231—237, 1968.
12. Japa J., Materlik H., Zych F.: Endokrynol. Pol. 18, 37—45, 1967.
13. Jonak J., Stęplewski Z.: Endokrynol. Pol. 14, 371—387, 1963.
14. Kędzia H., Kozłowska K., Zegarska Z.: Folia Morphol. 15, 291—296, 1964.
15. Kitay J. I.: Endocrinol. 2, 253—258, 1963.
16. Larski Z.: Wirusologia weterynaryjna. PWRiL, Warszawa 1965, 377—382.
17. Lupulescou R.: Endokrynol. Pol. 10, 398—399, 1951.
18. Malendowicz K. K.: Endokrynol. Pol. 25, 341—343, 1974.
19. Sturkie P. D.: Fizjologia ptaków. PWRiL, Warszawa 1970.
20. Szmidt G. A.: O rozwoju zarodka. PWN, Warszawa 1955.
21. Szukalski B.: Endokrynol. Pol. 22, 267—286, 1971.
22. Rodecki W., Wisławska-Orłowska B.: Endokrynol. Pol. 22, 261—263, 1971.
23. Zieleniewski J., Kolaszyński J.: Endokrynol. Pol. 22, 265—266, 1971.

Otrzymano 25 XI 1977.

РЕЗЮМЕ

Исследовали кору надпочечников цыплят, которым на 2 и 7 сутки эмбриональной жизни подали однократную дозу *Oestradiolum benzoicum*. Исследования проведено на 400 куриных зародышах расы „бройлер”. Определено, что примененный на второй день эмбрионального развития эстрадиол влиял токсически на зародыш, а примененный на 7 день не вызывал существенных морфологических изменений и дегенерации надпочечников а также кровоизлияний, а зато вызывал уменьшение количества внутринадпочечниковых клеток, понижая суданофильность и активность 3-бета-оль-гидроксистеридовой дегидрогеназа во внутринадпочечниковых клетках.

SUMMARY

The effect of a single dose of *Oestradiolum benzoicum* administered on the second and seventh day of chickens development on their adrenal cortex was examined. The studies were carried out on 400 hen gorms of "Brojler" phylum. Oestradiolum given on the second day of development had toxic effect upon the germ while oestradiolum given on the seventh day did not cause any essential morphological changes, degeneration of suprarenal glands or bloody extravasations but it effected the reduction in the number of mesosuprarenal cells, the decrease of sudanophilia and dehydrogenase 3- β -ol-hydroksysteroid activity in mesosuprarenal cells.

